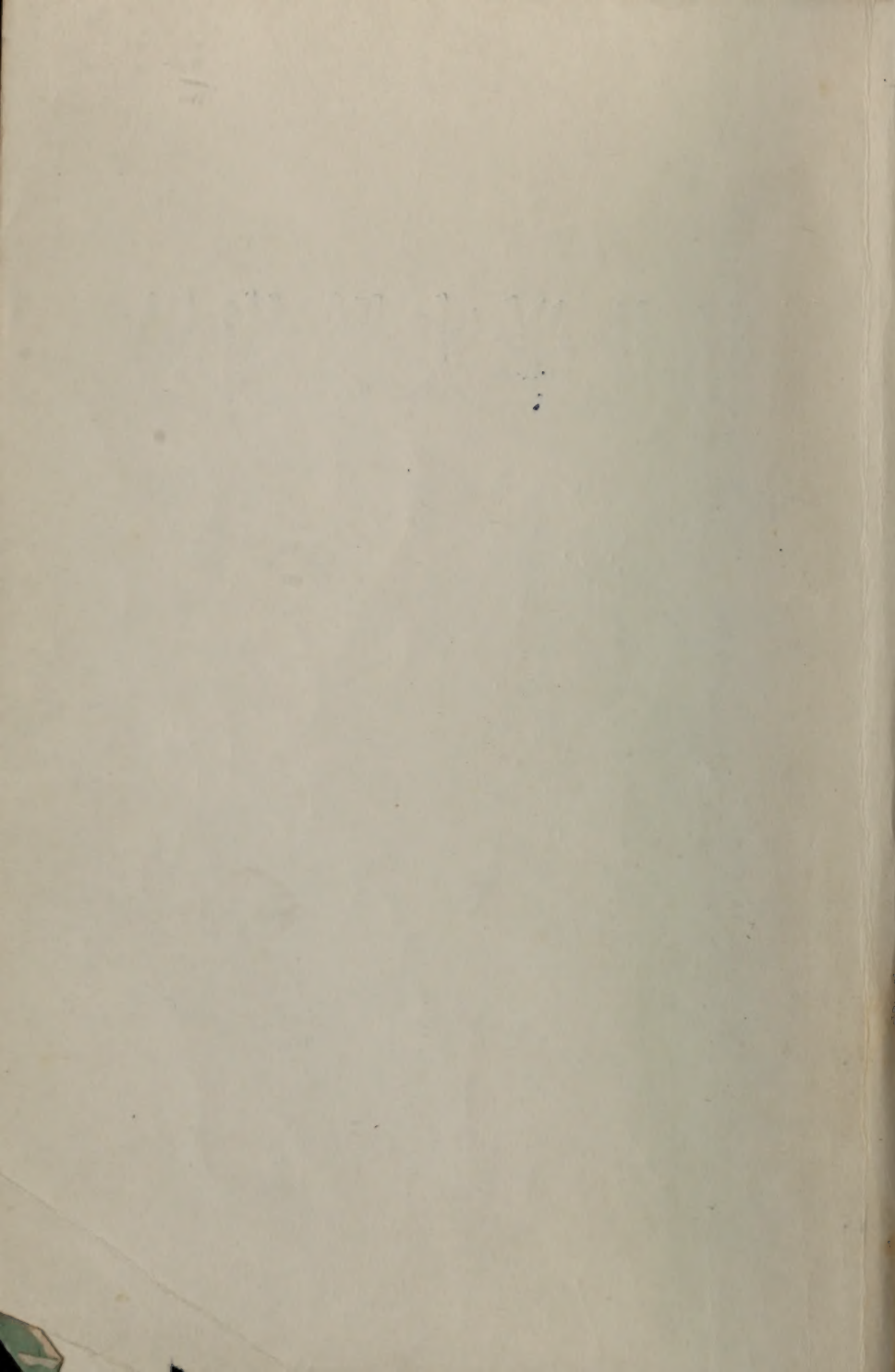


生物化学实验指导

北京大学生物学系
生物化学教研室編

人 民 教 育 出 版 社



50.173057
171(-2)

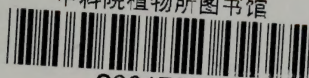
生物化学实验指导

(修订本)

北京大学生物学系
生物化学教研室编

中国科学院
人民教育出版社

中科院植物所图书馆



S0017398

本书自1958年出版以来，编者通过几年来的教学实践，又加以修改与补充。实验由42个增加到60个，并增加了参考书目、注解、附录，内容比教学大纲所规定的要多一些，便于读者在使用时有所选择。本书可供高等院校生物系各专业及有关科学工作人员参考。

参加本书编写工作的是北京大学生物学系生物化学教研室陈同度、郑昌学、王重庆、朱孔生等。

生物化学实验指导

(修订本)

北京大学生物学系生物化学教研室编

北京市书刊出版业营业许可证出字第2号

人民教育出版社出版(北京景山东街)

人民教育印刷厂印装

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

统一书号 13010·523 开本 850×1168 $\frac{1}{32}$ 印张 5 $\frac{1}{2}$

字数 117,000 印数 9,001—13,200 定价(5) 半0.50

1958年12月第1版 1964年12月第2版 1964年12月北京第4次印刷

目 录

再版序	v
-----	---

第一章 糖的化学 1

实验一 糖的颜色反应	1
实验二 糖的还原作用	6
实验三 糖脎的形成	10
实验四 血糖的定量测定	13

第二章 脂肪的化学 19

实验五 中性脂肪的组成	19
实验六 卵黄中卵磷脂的提取和鉴定	21
实验七 脑中磷脂的分离和鉴定	22
实验八 胆固醇的提取和鉴定	24
实验九 粗脂肪的定量测定	25
实验十 碘值的测定	27

第三章 蛋白质的化学 31

实验十一 蛋白质与个别氨基酸的呈色反应	32
实验十二 蛋白质的可逆沉淀	42
实验十三 蛋白质的不可逆沉淀	44
实验十四 蛋白质等电点的测定	48
实验十五 Sørensen 氏甲醛滴定法	50
实验十六 总氮量的测定	53
实验十七 双缩脲比色法测定蛋白质	56
实验十八 肝脏核蛋白的分离提取和核酸成分的鉴定	58
实验十九 脾脏脱氧核糖核蛋白的提取和鉴定	60
实验二十 酵母核糖核蛋白的水解及核糖核酸成分的鉴定	61

实验二十一 用定磷法测定组织中的RNA和DNA	63
-------------------------	----

第四章 维生素、激素及植物次生物 69

实验二十二 维生素A的定性试验	69
实验二十三 维生素D的苯胺试验	71
实验二十四 维生素B ₁ 的颜色反应	71
实验二十五 维生素B ₂ 的定性试验	73
实验二十六 尼克酸的定性试验	74
实验二十七 维生素B ₆ 的鉴定	76
实验二十八 维生素C的定量测定	76
实验二十九 肾上腺素的提取和鉴定	79
实验三十 肾上腺素对血糖含量的影响	80
实验三十一 胰岛素对血糖含量的影响	81
实验三十二 鞣质的定性反应	82
实验三十三 茶碱的提取和一些性质	83

第五章 酶 87

实验三十四 酶的特异性	87
实验三十五 唾液淀粉酶的激动和抑制	89
实验三十六 温度对酶活性的影响	90

实验三十七	pH 对酶活性的影响.....91	实验五十二	氨基移换反应 (二).....113
实验三十八	脂肪酶的定性试验.....93	实验五十三	氨基酸的生酮作用.....117
实验三十九	氧化酶的定性反应.....94	第七章	血液定量分析.....119
实验四十	细胞色素和细胞色素氧化酶的定性反应.....96	实验五十四	血清钾的测定.....119
实验四十一	琥珀酸脱氢酶活性的测定.....97	实验五十五	血清钙的测定.....120
实验四十二	过氧化物酶的定性反应.....98	实验五十六	血中无机磷的测定.....121
实验四十三	过氧化氢酶的定性反应.....99	实验五十七	血中胆固醇的测定.....123
实验四十四	黄酶的定性试验.....100	第八章	尿的分析.....125
实验四十五	碳酸酐酶的定性试验.....101	实验五十八	尿酸的测定.....125
实验四十六	蛋白酶活性的测定.....102	实验五十九	尿素的测定.....126
第六章	组织代谢.....104	实验六十	尿中病理成分的检查.....127
实验四十七	组织的自溶.....104	附录129
实验四十八	糖元酵解作用.....105	实验室规则.....129	
实验四十九	发酵过程中无机磷的利用.....107	实验基本操作和实验室常识.....131	
实验五十	脂肪酸的氧化.....108	容量仪器使用法.....133	
实验五十一	氨基移换反应 (一).....110	分析天平的使用和保护.....134	
		离心机的使用.....135	
		光电比色计原理和使用.....136	
		试剂的配制.....140	
		缓冲溶液及其配制.....149	
		计算公式.....152	
		一些常用数据表.....156	

再 版 序

这本生物化学实验指导原由陈同度教授担任主编，朱圣庚、徐长法两同志参加编写工作。自从 1958 年编就出版以来，在高等院校内开始学习和贯彻党的教育为无产阶级的政治服务、教育与生产劳动相结合的方针，以及执行学校工作中以教学为主的规定，关心学生的全面发展，加强学生的基础理论、基本知识和基本技能的教学，加强实验课，贯彻勤俭办学的精神等等。在北京大学生物学系里，生物化学实验课的教学内容和教学方法都曾经经历过多次革新的尝试，这些尝试体现了我们在贯彻党的教育方针方面的努力。当然，我们在生物化学教学过程中，学习和贯彻党的教育方针还只是一个开端，我们还需要继续不断的努力。

这里还必须说明，在这次修订生物化学实验指导的过程中，曾经得到许多兄弟院校的支持。他们在试用本书（初版）的过程中提供了许多宝贵意见；一些兄弟院校的教师又来到北京大学，和我们在一起，参加生物化学实验课的教学工作和革新工作。在此，谨向他们表示谢意。

至于这次修订，在内容上，比教学大纲要求的要多一些。这样做，便于不同院校在使用这本书时有选择的余地，也便于因材施教，使有条件的学生可以多做些实验。实验的内容增加了血液定量分析四个实验、尿的分析三个实验、脑中磷脂的分离和鉴定、肝脏核蛋白的分离提取和核酸成分的鉴定、用光电比色法测定谷丙转氨酶和氨基酸、维生素、酶的一些定性实验。另外，我们还增加了参考书目和注解。还有许多实验，在操作上或文字上作了修改。在附录中增加了实验基本操作和实验室常识、光电比色计原理和

使用、緩冲溶液的配制和一些常用数据表。把原来分散在定量实验中的一些计算公式汇集在一起，編入附录作为参考。不鼓励同学们直接使用这些计算公式。

这次修訂稿，仍由陈同度教授担任主編，并由郑昌学、王重庆、朱孔生等同志参加編写工作，范鎮基同志参加积累資料的工作，华惠芬同志参加实验工作。此外，北京大学 1960 級生物化学专业的部分同学在假期中曾为修訂的一些实验进行試做。向志恒同志抄写了大部分修訂稿。

我們誠摯地欢迎使用本书的教师、实验員、同学和讀者对本书提出批評和指正。

北京大学生物学系生物化学教研室

1964 年 3 月 27 日

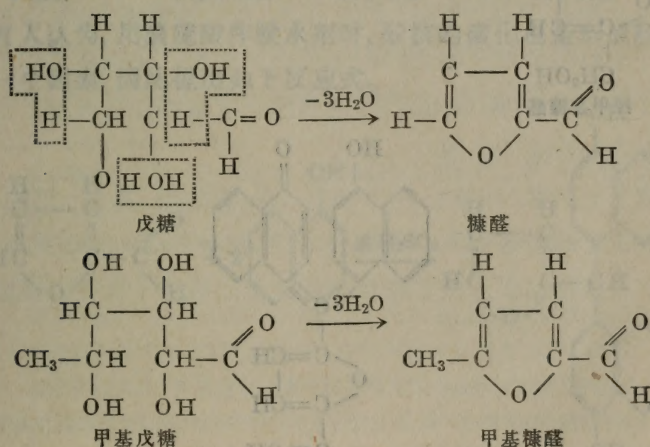
第一章 糖的化学

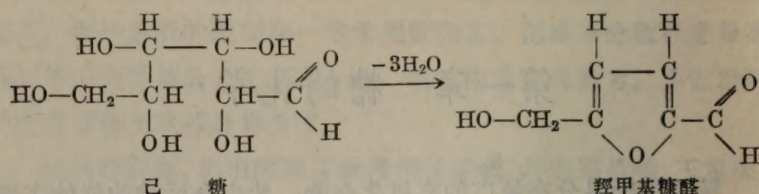
糖为生物界分布最广的有机化合物，为生命活动的能的主要来源。在植物组织中，其含量可达干重的 80%，在动物及人体组织中含量较少，约占干重的 2%。

糖亦称碳水化合物。按其化学构造，糖是多羟基的醛或酮及其衍生物。葡萄糖为一种醛糖，果糖为一种酮糖。通常根据分子中的单糖数目把糖分成三大类：(1)单糖，如葡萄糖、果糖和阿拉伯糖；(2)贰糖、叁糖和肆糖等低聚糖，如乳糖、麦芽糖、蔗糖和棉子糖；(3)多聚糖(多糖)，如淀粉、糖元和纤维素等。

实验一 糖的颜色反应

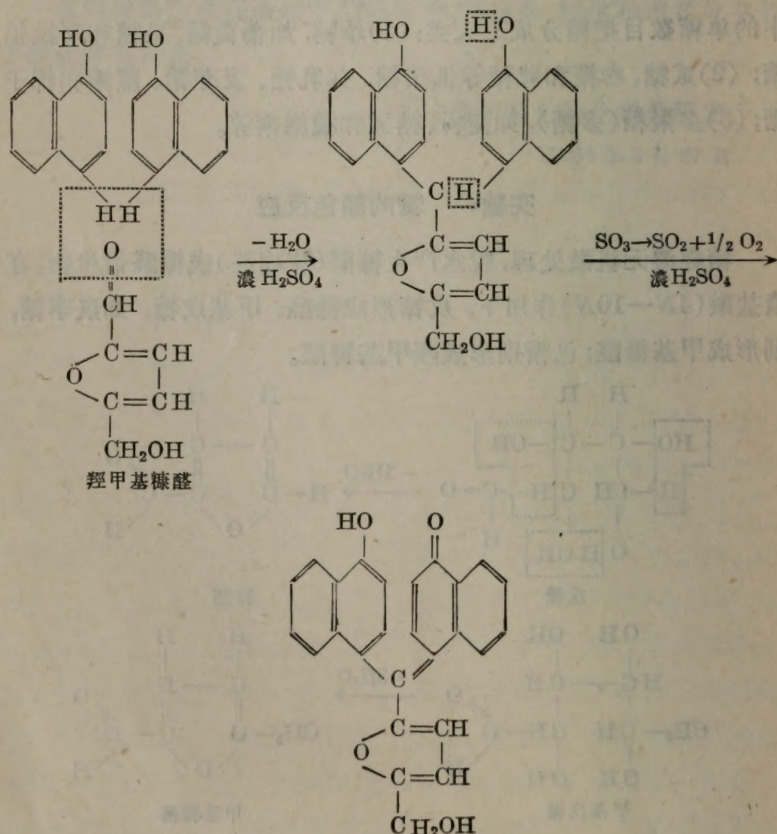
糖经浓无机酸处理，脱水产生糠醛(呋喃醛)或糠醛衍生物。在浓盐酸(4N—10N)作用下，戊糖形成糠醛；甲基戊糖，如鼠李糖，则形成甲基糠醛；己糖则形成羟甲基糠醛。

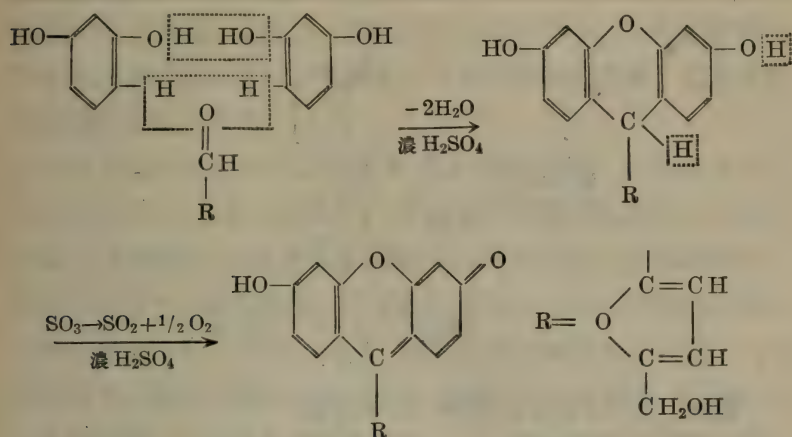




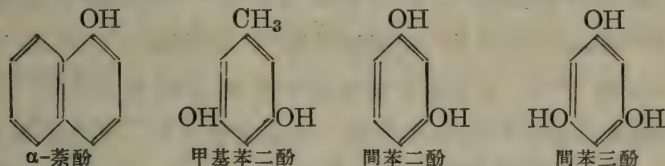
这些糠醛和糠醛衍生物在浓无机酸作用下，能与酚类化合物缩合生成有色物质。

与一元酚如 α -萘酚作用，形成三芳香环甲基有色物质。与多元酚如间苯二酚作用，则形成氧杂蒽有色物质

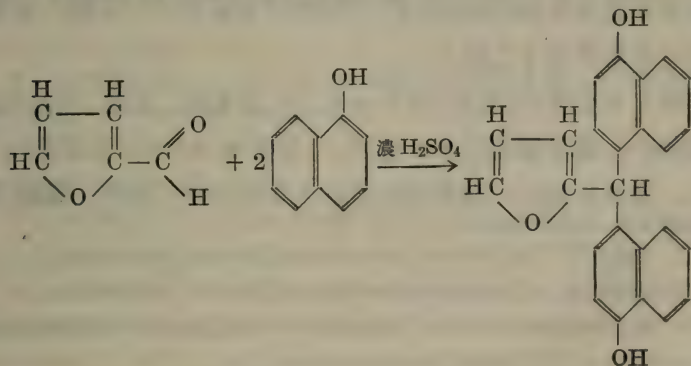


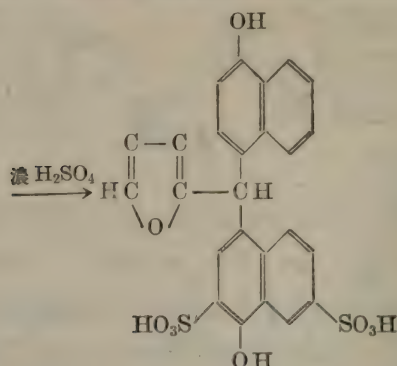


通常使用的无机酸为硫酸。如用盐酸，则必须加热。常用的酚类为 α -萘酚、甲基苯二酚、间苯二酚和间苯三酚等，有时也用芳香胺、胆酸、某些吡啶衍生物和一些嘧啶类化合物等。



有人认为，用浓硫酸作脱水剂时，酚核的磺化也是形成颜色产物的一个因素，因此提出如下反应式。





器材 (1)試管及試管架; (2)水浴鍋。

試劑 (1) 2% 葡萄糖溶液; (2) 2% 果糖溶液; (3) 2% 半乳糖溶液; (4) 2% 阿拉伯糖溶液; (5) 2% 麦芽糖溶液; (6) 2% 蔗糖溶液; (7) 1% 淀粉溶液; (8) 濃硫酸; (9) Molisch 氏試劑^{[1]①}; (10) Seliwanoff 氏試劑^[2]; (11) Tollen 氏試劑^[3]; (12) Bial 氏試劑^[4]。

(1) Molisch 氏反应 (α -萘酚試驗): 本試驗为 Molisch 氏在 1886 年发现^{(1,2)②}。它是鉴定糖类最常使用的顏色反应^③。自由存在的糖和以結合形式存在的糖, 均呈阳性反应。氨基糖不呈阳性反应。此外, 丙酮、甲酸、乳酸、草酸、葡萄糖醛酸、各种糠醛衍生物和甘油醛等呈顏色近似的阳性反应。因此, 阴性反应为无糖类物质存在之确证, 而阳性反应, 則只指出有糖存在之可能。反应形成的有色物质溶于乙醇。

取 5 支試管, 标号后, 分別加入 2% 葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖和 1% 淀粉等溶液各 1 毫升。再各加 Molisch 氏試劑 2 滴, 混匀。將試管傾斜, 沿管壁徐徐注入濃硫酸約 1 毫升。硫酸应与

① 这里的“[1]”表示书末附录中“試剂的配制”的序号, 其余依此类推。

② 这里的“(1,2)”表示本章末所附的参考书目的序号, 其余依此类推。

③ 本試驗非常灵敏, 0.001% 葡萄糖和 0.0001% 蔗糖溶液即能呈现阳性反应。因此, 不可使滤紙毛或碎屑混入样品中。

糖溶液很清楚地分成两层。随时观察两液面间的紫色环出现^①。数分钟内如无颜色变化，可在水浴中温热后再行观察。记录各管颜色出现的先后次序。

(2) Seliwanoff 氏反应(间苯二酚-盐酸试验): 本实验为 Seliwanoff 氏在 1887 年发现的⁽³⁾。它是酮糖的特异反应^②。在酸的作用下, 酮糖极易形成羟甲基糠醛, 所以反应迅速。在同样情形下, 醛糖形成羟甲基糠醛较慢, 只当浓度较高时, 或煮沸时间较长时, 才给出微弱的红色阳性反应^③。蔗糖和含有酮糖基的多糖, 在酸的作用下水解生成酮糖亦能给出阳性反应^④。戊糖亦呈 Seliwanoff 氏反应, 生成绿色到蓝色产物。在这里和间苯二酚缩合的物质是糠醛, 不是羟甲基糠醛。

取试管 4 支, 各加入 Seliwanoff 氏试剂 1 毫升, 再分别加入 2% 果糖、蔗糖、葡萄糖和阿拉伯糖溶液各 4 滴。混匀后, 置沸水浴内。1—2 分钟内观察并记录颜色变化。20 分钟后, 再进行观察, 记录颜色和有否沉淀。

(3) Tollen 氏反应(间苯三酚反应): 此反应是 Tollen 氏在 1896 年发现的⁽⁴⁾。它是戊糖、半乳糖和糖醛酸的特异反应。但采用这一方法时要十分小心, 特别是加热时间的长短。糖和酸以及试剂的浓度, 也应该很好地加以控制, 控制试剂的浓度特别重要。在

① 用果糖作实验时, 如溶液过浓, 由于硫酸对它的焦化作用, 将出现红色及褐色而不呈紫色。改用较稀的糖溶液重做。

② 本反应常被认为是果糖的特异反应。事实上, 山梨糖、丙酮糖、丁酮糖、甲醛果糖(福模糖)等酮糖, 都呈阳性反应。

③ 果糖的阳性反应十分迅速, 在煮沸 20—30 秒后即出现鲜红色, 而葡萄糖所需时间较长, 且只产生黄色到淡红色。

④ 蔗糖在酸作用下极易水解生成果糖和葡萄糖, 在 1—2 分钟后即呈阳性反应。因此, 酸浓度不能过高, 一般使用 12% HCl 溶液。近来, 有人用低浓度的 HCl 溶液或硫酸的醇溶液或改用较弱的有机酸如醋酸等来代替 12% HCl。

一定条件下，戊糖、半乳糖和糖醛都呈正反应。但戊糖反应最快，所形成的朱紅色沉淀溶于酒精和戊醇中，此溶液在D带和E带間有特异的吸收光带。阿拉伯糖先呈紫紅色，逐漸变成深紅色，煮得越久，顏色越深，并出現沉淀。半乳糖也呈类似的顏色反应，但其产物的醇溶液在D带和E带間无吸收光带，以此区别戊糖和半乳糖。果糖也产生反应，但先呈橘黃色，后呈棕色，糠醛也能产生与戊糖相同的結果。

取試管3支，各加入Tollen氏試剂1毫升，再分別加入2%阿拉伯糖、果糖及半乳糖溶液各1滴。將各試管放入沸水浴內煮2分钟，观察顏色变化。要注意观察阿拉伯糖紫紅色的迅速出現。

(4) Bial氏反应(甲基間苯二酚反应)^①：此反应之特异性与間苯三酚反应相同。戊糖和糠醛在濃无机酸的作用下都与甲基間苯二酚发生反应，产生深藍色的沉淀物。此沉淀物溶于正丁醇。在1907年Bial⁽⁵⁾观察到，加入少量 FeCl_3 可以增加此反应的灵敏度，因此，含有 FeCl_3 的甲基間苯二酚試剂称为Bial氏試剂。己糖也能发生反应，但产生灰綠色甚至棕色的沉淀物，而不产生深藍色的沉淀物。

取2支試管，各加入1毫升Bial氏試剂，再分別加入2滴2%葡萄糖和阿拉伯糖溶液。在沸水浴中加热。阿拉伯糖經綠色而成深藍色沉淀^②。

实验二 糖的还原作用

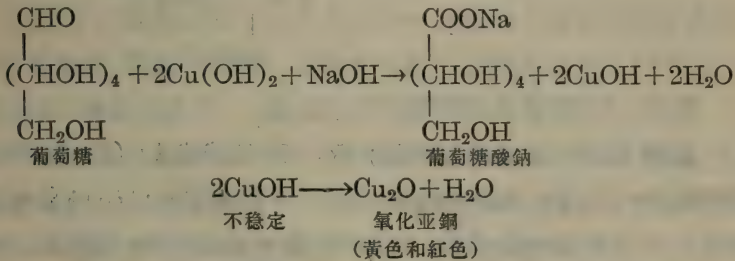
含有自由醛基($-\text{CHO}$)或酮基(>C=O)^③的单糖和貳糖为

① 此反应原为Tollen氏反应，后經Bial氏修改，所以称Bial氏反应。

② 在測定未知糖时，如果顏色不明显，可以用3倍体积水冲稀反应产物，并加入1毫升戊醇，搖动。如有藍綠色在醇溶液中出現，即为阳性反应。

③ 酮基本身并没有还原作用，只有在变为烯醇式后，才显示还原性。

还原糖。在碱性溶液中,还原糖能将金属离子(铜、铋、汞、银等)还原,糖本身被氧化成酸类化合物。这种作用在微酸溶液中亦能进行,但速度较慢。硫酸铜与碱溶液混合加热,则生成黑色的氧化铜沉淀。若同时有还原糖存在,则产生黄色或红色的氧化亚铜沉淀。沉淀的颜色决定于 Cu_2O 颗粒的大小, Cu_2O 颗粒的大小又决定于反应的速度。反应快时,生成的 Cu_2O 颗粒较小,呈黄绿色;反应慢时,生成 Cu_2O 颗粒较大,呈红色。实际生成的沉淀含有大小不同的 Cu_2O 颗粒^①。有保护胶体存在时,常常生成黄色沉淀。上述反应可用下列方程式表示:

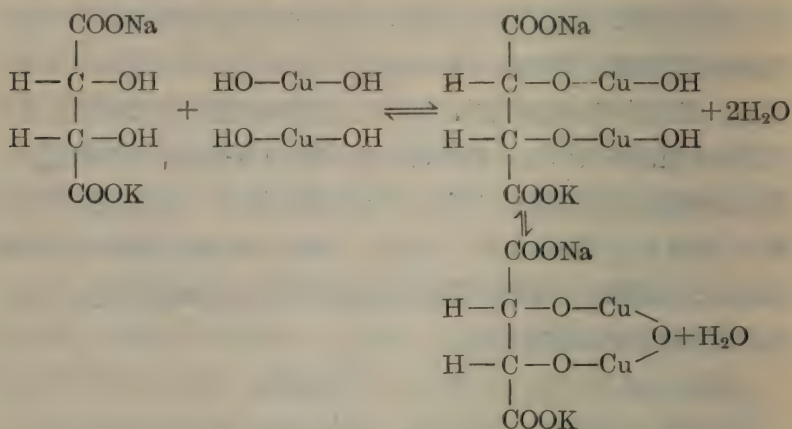


但是糖在碱的作用下,不仅产生烯醇化、异构化等作用,从而促进还原的进行,同时也能发生糖分子的分解、氧化、还原或多聚作用等。由这些作用所形成的复杂混合物具有强烈的还原作用。因此,企图用简单的氧化作用来写出糖的反应平衡式,或用简单的还原作用来写出金属离子的反应平衡式,都不太可能。

为了防止铜离子和碱反应生成氢氧化铜或碱性碳酸铜沉淀,可于铜试剂中加入适量的檸檬酸盐(Benedict 氏试剂)、酒石酸钾钠(Fehling 氏试剂)、甘油(Haines 氏试剂)或 NH_3 (Purdys 氏试剂)。这些含羟基的有机化合物能与铜离子反应生成可溶性的络离子。反应是可逆的,平衡后,溶液内含有一定浓度的氢氧化铜。

^① 也有人认为生成之沉淀为黄色 CuOH 和红色 Cu_2O 的混合物。

以酒石酸鉀鈉为例, 反应式如下:



器材 (1) 試管及試管架; (2) 水浴鍋。

試剂 (1) 2% 葡萄糖溶液; (2) 2% 果糖溶液; (3) 2% 阿拉伯糖溶液; (4) 2% 麦芽糖溶液; (5) 2% 蔗糖溶液; (6) 1% 淀粉溶液; (7) 1% 硫酸銅溶液; (8) 10% 氫氧化鈉溶液; (9) Fehling 氏試剂^[5]; 試剂 A、試剂 B (临时等量混合); (10) Benedict 氏試剂^[6]; (11) Barfoed-Tauber-Kleiner 試剂^[7]; (12) 磷鉬酸試剂^[8]。

(1) Trommer 氏試驗: 取試管 4 支, 分別加入 2% 葡萄糖、果糖、蔗糖、阿拉伯糖溶液各 1 毫升。再各加 10% 氫氧化鈉溶液 1 毫升, 搖勻, 滴加 1% 硫酸銅溶液, 直至发生輕微混浊为止。放入沸水浴內加热, 观察有无黃色或紅色沉淀^①。

(2) Fehling 氏反应^[6]: Fehling 氏反应是 Trommer 氏反应的

① 反应液加热过久, 則溶液变成棕褐色, 且有黑色沉淀。这一方面由于糖在濃碱的作用下分解成各种产物, 使溶液变棕褐色 (Moore 氏反应); 另一方面是由于多余的没有被絡合的 Cu^{++} 在碱性溶液中加热而生成黑色 CuO 沉淀。因为棕褐顏色和黑色沉淀对实验干扰, Trommer 試驗已不常被采用。但作为原始的还原反应試驗, 以便用来与下述 Fehling 氏和 Benedict 氏反应作对比, 还是有意义的。

修改,是还原糖特有的反应^①。在 Fehling 氏试剂中,除了 NaOH 和 CuSO_4 以外,还有酒石酸钾钠作为 Cu^{++} 的络合剂。

取 5 支试管,各加入 Fehling 氏试剂 A 和 Fehling 氏试剂 B 各 1 毫升。混匀后,分别加入 2% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、阿拉伯糖和 1% 淀粉溶液各 4 滴^②。放入沸水浴内煮 2—3 分钟后,冷却。注意沉淀和颜色的变化^③。

(3) Benedict 氏反应^(7,8): Benedict 氏试剂是 Fehling 氏试剂的改良。它利用柠檬酸作为 Cu^{++} 的络合剂,同时其碱性比 Fehling 氏试剂弱。因此,它在实际应用中有更大的优点^④。

于 4 支试管中先各加入 Benedict 氏试剂 2 毫升,再分别加入 2% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖各 4 滴。在沸水浴中煮 2—3 分钟。冷却后,观察变化^⑤。

(4) Barfoed 氏反应⁽⁹⁾: 本实验的特点是还原作用在酸性溶液中进行。在这种情况下,单糖和还原贰糖的还原速度有明显差异,单糖在 3 分钟内就能还原 Cu^{++} 而还原贰糖则需 20 分钟^⑥。

① 溶液中如含有氯仿,热碱可使之分解生成还原性物质,也呈阳性反应。某些本质上不是醛或还原糖的化合物,如苯肼、胍、酰胺、多元酚、二苯羟乙酮等也能使试剂还原。芳香醛与试剂不起作用。铵盐对反应有干扰,如果被检溶液(如尿)中铵盐过多,应加入 Na_2CO_3 至碱性,并加热煮沸,使铵盐分解。

② 如果被检液呈酸性,在试验前,应中和或碱化。

③ 由于 Benedict 氏反应的灵敏度高和干扰因素少,同时只需要一个溶液, Fehling 反应已在实际应用中为 Benedict 氏反应所代替。

④ 溶液中有 0.01% 葡萄糖就可以检验出来。0.2—0.3% 葡萄糖就能迅速形成沉淀。脂肪醛(除甲醛外)也能发生反应。不受氯仿干扰,尿酸盐或肌酸酐等尿中的其他成分的干扰程度也小于 Fehling 氏反应。

⑤ 溶液中还原糖的浓度可以从生成的沉淀多少来估计,而不能从沉淀的颜色来区别。

⑥ 有人曾测过葡萄糖等单糖烯醇化所需的最低 pH 为 4 左右。因此,在弱酸溶液中单糖能进行烯醇化而表现还原性,而还原贰糖则不能。

所以可以用来区别单糖和还原贰糖。加热时间如过长，非还原性糖亦能水解而呈现还原反应，如蔗糖在 10 分钟内水解而发生反应。还原贰糖浓度过高时也会很快呈现阳性反应。因此，在分析研究时，必须掌握条件。Barfoed 氏原先是用约 0.15N 醋酸，但易于挥发。Tauber 和 Kleiner 二氏改用乳酸，并利用磷钼酸作为显色剂，使灵敏度进一步提高。改名为 Barfoed-Tauber-Kleiner 反应⁽¹⁰⁾。

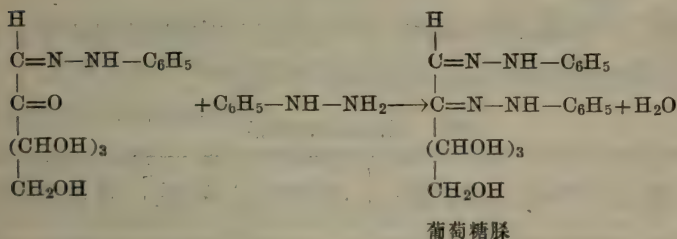
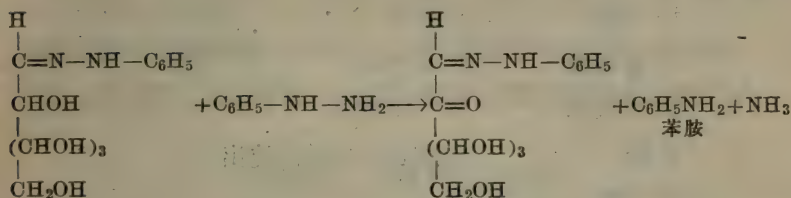
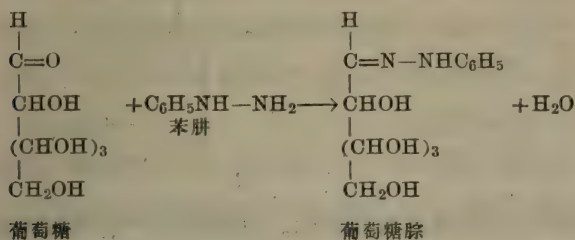
(A)取 2 支试管，分别加入 2% 葡萄糖、麦芽糖溶液各 3 滴，再各加 Barfoed-Tauber-Kleiner 试剂 1 毫升，在沸水浴中加热 3 分钟。冷却后，观察变化^①。

(B)取 2 支试管，分别加入 2% 葡萄糖和麦芽糖溶液各 3 滴，再各加 Barfoed-Tauber-Kleiner 试剂 1 毫升，在沸水浴中加热 3 分钟。冷却后，各加 1 毫升磷钼酸显色剂。混合。观察并记录变化。

实验三 糖脎的形成

Fischer 氏⁽¹¹⁾第一个指出，许多糖在稀醋酸溶液中能与苯肼化合生成脎。后来发现这些糖为含有自由醛基或酮基的还原糖。还原糖与苯肼或苯肼衍生物在一定条件下共热，首先形成特异的苯腙(糖脎)。苯腙一般溶于水并且继续进行反应，不易分离。它与另一分子苯肼发生反应，形成脎的氧化产物，而苯肼被还原成苯胺和 NH_3 。苯腙氧化产物再与另一分子苯肼发生反应，形成苯脎(糖脎)。

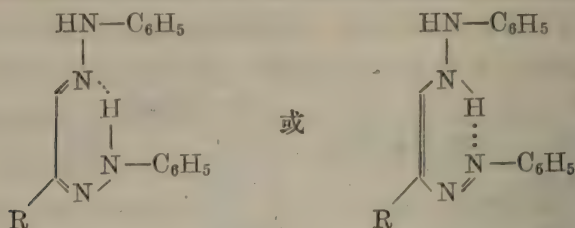
① NaCl 干扰 Barfoed 氏反应，因此不能用作尿的试验。在酸性条件下，反应产生的 Cu_2O 沉淀聚集在试管底部，溶液仍为深蓝色。观察结果时，应看试管底部红色的出现，不是像其他一般还原性实验那样，反应液由蓝变绿变黄或变红。



不同还原糖所生成的脎，化学构造不同，晶形、熔点和溶解度亦各不相同^①。因此，成脎反应可用来鉴别各种还原糖。因为第3到第6四个碳原子构形相同，果糖、葡萄糖和甘露糖则均形成葡萄糖脎。

糖脎比较稳定，因为它可以借氢键形成螯形结构。

^① 因为结晶形状可以随结晶条件改变，熔点实际上是分解点，温度间距也较大，成脎反应不是鉴定糖的理想方法。



不同的糖形成糖脎的速度不同。Mulliken⁽¹²⁾曾得出一些糖成脎的速度次序如下:

D-果糖	2 分钟
D-葡萄糖	4—5 分钟
D-半乳糖	15—19 分钟
乳糖	在溶液冷却后沉淀出
麦芽糖	同 上
蔗糖	30 分钟内无反应

事实上,实验条件不同时,反应速度也不同,但快慢次序不变。

有关成脎反应的理論,可参閱参考书目⁽¹³⁾。

表 1. 脎的晶形和熔点

名 称	半乳糖脎	葡萄糖脎	麦芽糖脎	乳糖脎	阿拉伯糖脎
結 晶 形	长薄片状	黄色細針状	长薄片状	細針状	长細和各种曲线状
熔 点	214°C	204—205°C	205—206°C	200°C	167°C

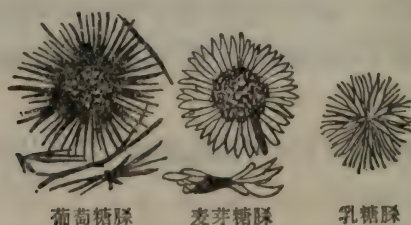


图 1. 脎的晶形。

器材 (1)試管及試管架；(2)水浴鍋。

試劑 (1)盐酸苯肼-醋酸鈉混合物 (比例 2:3)^①；(2) 2% 葡萄糖溶液；(3) 2% 麦芽糖溶液；(4) 2% 乳糖溶液；(5) 2% 蔗糖溶液。

操作 取試管 4 支，分別加入 2% 葡萄糖、麦芽糖、乳糖和蔗糖溶液各 2 毫升。再各加入新配制的盐酸苯肼-醋酸鈉混合物約 0.5 克。混勻，置沸水浴中（一定要煮沸）。随时將出現沉淀的試管取出，并記錄時間。煮 20 分鐘后，將所有試管取出，在室溫下慢慢冷卻^②。注意有无沉淀产生。用小吸管吸出結晶，放在載片上。用盖片盖好后，在顯微鏡下观察并繪出沉淀的結晶形状和大小。

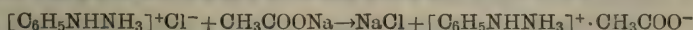
實驗四 血糖的定量測定

Hagedorn-Jensen 二氏定糖法

正常人空腹血样的血糖含量約为 80—120 毫克%。糖代謝紊乱，如患糖尿病时，血糖含量有显著变化。測定血糖，对診斷糖代謝紊乱状况，有临床价值。

血糖的測定，多是根据糖在热碱性溶液中对某些高价离子的还原作用。最常用的有两价金屬銅离子 Cu^{++} 和高铁氰离子 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$ 。Folin 和吳宪二氏⁽¹⁴⁾用銅作氧化剂，用比色法測定生成的氧化亚銅，来計算血糖量。此法又被 Somogyi⁽¹⁵⁾ 及 Nelson⁽¹⁶⁾改进。Hagedorn-Jensen⁽¹⁷⁾ 利用高铁氰离子来氧化血糖，再用碘滴定法測定剩余的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{--}$ ，也可算出血糖量。用 Ha-

① 往往用苯肼的盐酸盐代替苯肼。因此，反应要在有醋酸鈉的条件下进行。盐酸苯肼与醋酸鈉首先进行置換反应，形成游离的苯肼。

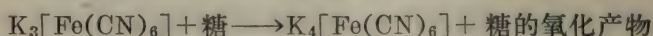


② 最好在溫水中保溫結晶，形成的晶体大而清楚。

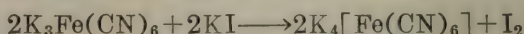
gedorn-Jensen 定糖法所测得的血糖，不仅包括葡萄糖，还包括血中一些其他还原物质如尿酸、肌酐、谷胱甘肽等^①。但这些还原性物质在血中含量不多，影响不大。

Hagedorn-Jensen 二氏定糖法，是一个微量定糖法。其原理如下。

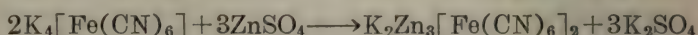
先将被檢驗血^②与氢氧化鋅胶体溶液共热，除去血中蛋白质。滤液与一定量过量的铁氰化鉀(紅血盐) $K_3[Fe(CN)_6]$ 共热，使部分的铁氰化鉀被还原为亚铁氰化鉀(黃血盐, $K_4[Fe(CN)_6]$)。



剩余的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 可用碘滴定法测定。



这一反应是可逆的。为了使此反应进行完全，除加入醋酸酸化外，并加入硫酸鋅来沉淀 $Fe(CN)_6^{4-}$ 离子。硫酸鋅与 $K_4[Fe(CN)_6]$ 反应生成不溶性的复盐。



試剂中的氯化鈉可使生成的 $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$ 胶体复盐更易沉淀出来。

反应中生成的游离碘，用硫代硫酸鈉滴定。在一定实验条件下，还原糖与被还原的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 具有一定数量关系。

还原糖多，剩余的 $K_3[Fe(CN)_6]$ 就少，产生出来的游离碘也就少，滴定碘的硫代硫酸鈉用量也少。由此可见，糖量和硫代硫酸鈉用量成相反关系。但这种关系并不是精确的反比关系。这可能是因为还原糖与铁氰化鉀的反应程度受这两种物质相对浓度的影

① 这些还原物质的还原作用相当于 20—30 毫克葡萄糖/100 毫升血液。

② 一般由饥饿 24 小时的动物身上取血。用全血测定血糖。为防止血凝和血糖因酵解而损失，可加入氟化鈉及草酸鉀的混合物(1:3)。每 5 毫升血加此混合物 20 毫克。經此处理的血样，在 2—3 天内，血糖无变化。

响。硫代硫酸鈉用量和还原糖数量的相反关系是由經驗确定下来的(可由表中查得)。因此,本实验要求严格地执行操作規程,如反应的溫度,加热时间的长短等。

器材 (1)試管及試管架; (2) 0.1 毫升微量吸量管 2 支; (3) 水浴鍋; (4) 金屬架(放試管及錐形瓶用); (5) 小玻璃漏斗 4 个; (6) 50 毫升錐形瓶 4 个; (7) 1、2、3 和 5 毫升吸量管各 1 支; (8) 2 毫升微量滴定管; (9) 脫脂棉花。

試剂 (1) 0.45% 硫酸鋅溶液; (2) 0.1N 氫氧化鈉溶液; (3) 血液^[10]; (4) 0.005N 标准铁氰化鉀碱性溶液^[11]; (5) 氯化物-硫酸鋅-碘化鉀溶液^[12]; (6) 3% 醋酸溶液; (7) 1% 淀粉溶液(溶于飽和 NaCl 溶液中); (8) 0.005N 标准硫代硫酸鈉溶液^[13]。

操作 取 4 支試管, 記上 1、2、3、4 四个号碼, 各加入 0.45% 硫酸鋅溶液 5 毫升及 0.1N 氫氧化鈉溶液 1 毫升, 混匀。这样制备的氫氧化鋅胶体溶液, 可沉淀除去血液中的蛋白质^①。

向 1、2 号兩試管内, 用微量吸量管各量入血液 0.1 毫升。仔細地反复吸入并放出氫氧化鋅胶体溶液 3—4 次, 以洗淨吸量管中殘存的血液。第 3、4 号兩試管为空白对照, 不加血液。将上述 4 支試管一起放入沸水浴中加热 4 分钟(准确!)。此时, 蛋白质呈褐色絮状物上浮, 溶液变得透明^②。冷却后, 通过塞有已湿润过的小棉花球的小漏斗^③, 將試管内容物分別滤入标有 1、2、3、4 号碼的 4 个 50 毫升錐形瓶內。用蒸餾水冲洗殘渣 2 次, 每次用 3 毫升。将洗液通过棉花球滤入錐形瓶內, 与滤液合并。

① 氫氧化鋅胶体制成后, 应尽快地加入血液样品。否則, 加热后, 溶液不透明。

② 若溶液不透明(黄褐色), 滤液也不透明, 最后測得的血糖偏高, 有时会高出很多。

③ 取約 20 毫克的棉花作成棉花球較合适, 棉花用量多, 会吸附一些糖。棉花球不宜过紧, 也不宜过松。

用微量滴定管,准确地在每个锥形瓶内,加入标准铁氰化钾碱性溶液 2 毫升。

将 4 个锥形瓶同时放入沸水浴中煮 15 分钟(必须准确)。取出锥形瓶,立刻在水龙头下冷却。向每个锥形瓶中添氯化物-硫酸锌-碘化钾溶液 3 毫升和 3% 醋酸 2 毫升,混匀。

将锥形瓶放在白瓷板上,由微量滴定管用 0.005 *N* 硫代硫酸钠溶液滴定。俟瓶内黄色变得很浅后(不要过了终点),加 1% 淀粉溶液 2 滴,继续滴定至瓶内蓝色恰恰消失为止(滴定终点)。

计算 根据血糖换算表,将样品滴定值和空白对照滴定值折合成糖值。两糖值相减,即得 100 毫升血液中所含葡萄糖毫克数。

表 2. Hagedorn-Jensen 二氏血糖换算表

0.005 *N* $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 用量(毫升)和血液中葡萄糖含量(毫克/100毫升)
的换算关系

硫代硫酸 钠毫升数	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0.1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0.2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0.3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0.4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0.5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0.6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0.7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0.8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0.9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1.0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161

1.1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1.2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1.3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1.4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1.5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1.6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1.7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1.8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1.9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

参 考 书 目

- (1) Molisch, H., Monatsh., **7**, 198(1886).
- (2) Bredereck, H., Ber., **64**, 2856(1931); **65**, 1110(1932).
- (3) Seliwanoff, T. H., Ber., **20**, 181(1887).
Martin, R. W., H. Z. für physiol. Chem., **259**, 62(1939).
- (4) Tollen, S. B., Ber., **29**, 1202(1896).
- (5) Bial, M., Biochem. Zeit., **3**, 323(1907).
- (6) Fehling, H., Annalen der Chemie, **72**, 106(1849).
- (7) Benedict, S. R., J. Biol. Chem., **3**, 101(1907).
- (8) Benedict, S. R., J. Biol. Chem., **5**, 485(1908—09).
- (9) Barfoed, C., Z. Anal. Chem., **12**, 27(1873).
- (10) Tauber, H. and Kleiner, I. S., J. Biol. Chem., **99**, 249(1932).
- (11) Fischer, E., Ber., **17**, 579(1884); **20**, 821(1887).
- (12) Mulliken, S. P., The Identification of Pure Organic Compounds, Vol. I, p. 29, John Wiley and Sons, New York, 1st Ed. (1914).
- (13) Percival, E. G. V., Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. **I**, p. 23(1948).
- (14) Folin, O. and Wu, H. (吴宪), J. Biol. Chem., **41**, 367(1920).
- (15) Somogyi, M., J. Biol. Chem., **117**, 771(1937); **160**, 161(1945).

-
- (16) Nelson, N., J. Biol. Chem., **153**, 375(1944).
- (17) Hagedorn, H. C. und Jensen, B. N., Biochem. Z., **135**, 46 (1923).

第二章 脂肪的化学

在人类、动物和植物組織的基本組成成分中,除了蛋白质和糖之外,尚有脂肪和类脂质。脂肪是高級脂肪酸的甘油三酯,类脂质是在化学或物理性质上类似脂肪的物质。

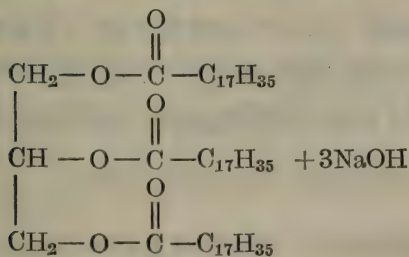
脂肪及类脂质总称为脂肪类化合物。脂肪类化合物一般都溶于脂肪溶剂,如乙醚、石油醚、二硫化碳、氯仿和苯等,但不溶于水或微溶于水。

根据化学成分,脂肪类化合物可分为三类:(1)眞脂(或中性脂肪)如油和脂;(2)类脂质如磷脂、固醇酯和蜡等;(3)衍生脂肪——脂肪类化合物的水解产物,包括脂肪酸、脂肪族之高分子醇及固醇。

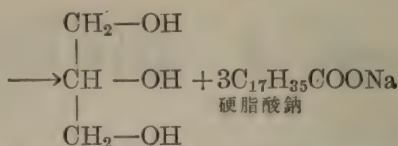
脂肪类化合物在机体中具有重要意义。眞脂的卡价高,为生物体的儲能物质,所以又称为儲藏脂肪。类脂质是构成生物細胞物质的重要成分,因此又称結構脂肪。神經系統、性腺、精子和腎上腺皮质等組織中类脂质的含量丰富。

实验五 中性脂肪的組成

油和脂也叫做眞脂,都是中性脂肪,是高級脂肪酸与甘油构成

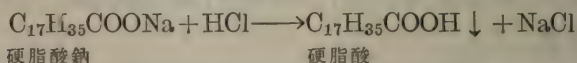


三硬脂酸甘油酯

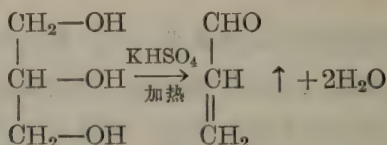


的甘油酯。在酸、碱或酯酶催化作用下，易被水解。用氢氧化钠或氢氧化钾作水解催化剂时，水解产物为能溶于水的脂肪酸钠盐或钾盐（即肥皂）和甘油。这种水解过程称为皂化作用。

用无机酸酸化皂化液，则难溶于水的高级脂肪酸分离析出。



甘油与脱水剂（如 KHSO_4 、 P_2O_5 、 CaCl_2 或无水 Na_2SO_4 ）共热，或单独热至 450°C 以上时，则脱水生成丙烯醛。丙烯醛有刺激性和特臭，可供辨别。丙烯醛还可以还原银离子成金属银⁽¹⁾。



器材 (1) 试管及试管架；(2) 100 毫升锥形瓶；(3) 10 毫升量筒；(4) 水浴锅；(5) 玻璃漏斗。

试剂 (1) 提炼过的猪油；(2) 0.5N 氢氧化钠酒精溶液^[14]；(3) 10% 盐酸；(4) 3N 氢氧化钠溶液；(5) 甘油；(6) 固体硫酸氢钾；(7) 无水酒精；(8) 10% 硝酸银溶液；(9) 浓氨水。

操作 (1) 皂化：称取猪油约 0.7 克，置于 100 毫升锥形瓶中，加 10 毫升 0.5N 氢氧化钠酒精溶液。瓶口加软木塞，塞中插有长玻璃管作为回流冷凝器，置沸水浴中加热 $\frac{1}{2}$ —1 小时。冷却，备用。

(2) 脂肪酸的分离：将新得的皂化液在水浴上温热，徐徐滴加 10% 盐酸酸化，随加随摇，直至淡黄或白色脂肪酸完全析出为止。

冷卻後，過濾。保留濾液作鑑定甘油用，用少量蒸餾水洗滌濾紙上的脂肪酸，直至洗滌液對石蕊試紙呈中性反應。從濾紙上取少量脂肪酸溶于 95% 酒精中，用石蕊試紙證明此酒精溶液的酸性反應。

再取少量脂肪酸置試管中，先加 10 毫升蒸餾水，再加 3*N* 氫氧化鈉溶液 2—3 滴。加熱，但勿煮沸。用力搖蕩，脂肪酸與鹼化合成肥皂。加入鹽酸酸化，則脂肪酸再度析出。

(3) 甘油的分離與鑑定：取一支試管，加入甘油數滴和固體硫酸氫鉀少許，混勻。另外，取一紙條，用含有數滴硝酸銀溶液的濃氨水浸濕，掛在試管口上。徐徐向試管加熱，注意丙烯醛之特臭并觀察在紙條上出現的棕黑色金屬銀。加熱不能過急，否則一部分 KHSO_4 被甘油還原，產生 SO_2 氣體。 SO_2 也有特臭，雖與丙烯醛之特臭不同，容易干擾試驗。

在水浴上蒸干本實驗操作(2)的濾液。加無水酒精 5 毫升。攪勻後，靜置數分鐘。濾入試管內，在水浴上濃縮濾液至漿狀。按照上法鑑定有無甘油。

實驗六 卵黃中卵磷脂的提取和鑑定

機體的各种組織和細胞均含卵磷脂。在卵黃（約含 10%）、神經、精液、腦髓、骨髓、腎上腺、肺、心臟、蘑菇和酵母等組織內含量更高。

純卵磷脂是白色蠟狀塊，不溶于水，易溶于醇、氯仿、乙醚和二硫化碳中，但不溶于丙酮。利用這一性質可與中性脂肪分離。

器材 (1) 小燒杯；(2) 玻璃棒；(3) 水浴鍋；(4) 玻璃漏斗；(5) 干燥試管及試管架。

試劑 (1) 雞卵黃；(2) 95% 乙醇；(3) 10% 氫氧化鈉；(4) 丙酮。

操作 (1)提取: 取鸡卵黄約 2 克, 放入小燒杯內。注入 15 毫升热的 95% 乙醇, 并同时攪拌。冷后, 滤入干燥試管内, 如滤液混浊, 重滤, 直到完全透明。将滤液在水浴上蒸干。

(2)三甲胺試驗: 取以上制得的卵磷脂一部分, 放入試管中。加 10% 氫氧化鈉溶液 2 毫升并在水浴上加热。卵磷脂分解生成胆碱, 胆碱在碱的作用下, 形成三甲胺。注意三甲胺的魚腥味。

(3)另取一些卵磷脂, 溶于 1 毫升乙醇中, 添加丙酮 1—2 毫升。观察变化。

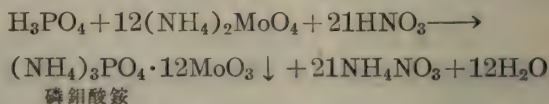
实验七 脑中磷脂的分离和鉴定

类脂是动植物細胞組織的重要成分。某些植物种子內較多, 动物則在脑、肝、心、脾等組織中較多。卵磷脂、脑磷脂、胆固醇均溶于乙醚, 神經磷脂不溶于乙醚。卵磷脂、脑磷脂不溶于丙酮, 胆固醇則溶于丙酮。卵磷脂溶于乙醇而脑磷脂則不溶。运用这些溶解性质上的差別可将各种类脂分离。磷脂类都是很好的乳化剂。

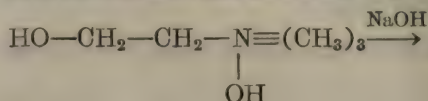
磷脂可被碱水解为脂肪酸盐、甘油、磷酸盐及含氮碱基。这些成分可以用适当方法来分別鉴定。

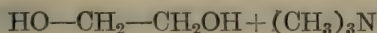
甘油可以按照实验五中的方法鉴定。

将类脂质碱水解液酸化, 脂肪酸即行析出。磷酸盐在酸性条件下与鉬酸鉍作用生成黄色磷鉬酸鉍沉淀, 反应如下。



在碱性溶液中加热, 胆碱分解生成具有魚腥味之三甲胺。三甲胺为碱性物质, 能使湿的紅色石蕊試紙变藍。





器材 (1)研鉢; (2)小漏斗; (3)試管; (4)水浴鍋; (5)蒸发皿; (6)离心管; (7)离心机。

试剂 (1)乙醚; (2)丙酮; (3)10% NaOH; (4)濃硝酸; (5)0.1M 鉬酸鉍; (6)醋酸酐; (7)濃硫酸; (8)甘油; (9)无水 CaCl_2 ; (10)紅色石蕊試紙。

操作 取 1—2 克动物脑子,加少許用水洗过的細砂粒,用力磨碎后轉入試管中。加 5 毫升乙醚,用木塞塞管口,充分振蕩数分钟。放置 10 分钟后,将上层提取液傾入离心管中,殘渣再用 3 毫升乙醚提取一次。将两次提取液合并,溶液如不清亮,可以离心一次。在 50°C 水浴中濃縮到 0.5 毫升。将濃縮液放在冰水浴中,冷却后,加入冷的丙酮 2 毫升,在冰水浴中放置 5 分钟使卵磷脂和脑磷脂尽可能完全沉淀出来。离心(1500 轉/分約离 5 分钟)。

将上清液傾入小瓷蒸发皿中并在水浴上蒸干(不能直接用火加热)备用。

向沉淀加少許蒸餾水,振蕩,观察胶状乳化液的形成(为什么?)。向乳化液中加入 4 毫升 10% NaOH^①。加热至沸,在管口挂一条湿的紅色石蕊試紙观察顏色有无变化,同时不断地注意有无魚腥味。水解 15 分钟后,向水解液中加入濃 HNO_3 至明显酸性^②,有不溶物析出(这是什么物质?)。过滤。取滤液 2 毫升,在試管中加入 0.5 毫升 0.1M 鉬酸鉍^③。在水浴中加热并观察結果。将滤渣用少量 10% NaOH 溶解(不能溶时,則在水浴上加热),再加入硝酸酸化,則脂肪酸再度析出。

向蒸发皿中的殘渣加入 2 毫升氯仿,使之溶解,再加入 1.5—2.0

① 不要将碱沾在試管口上,否則妨碍下一步檢驗三甲胺試驗。

② HNO_3 不能加得过多,否則影响磷鉬酸鉍反应。

③ 鉬酸鉍用量不可过多,最好用新配制的试剂。

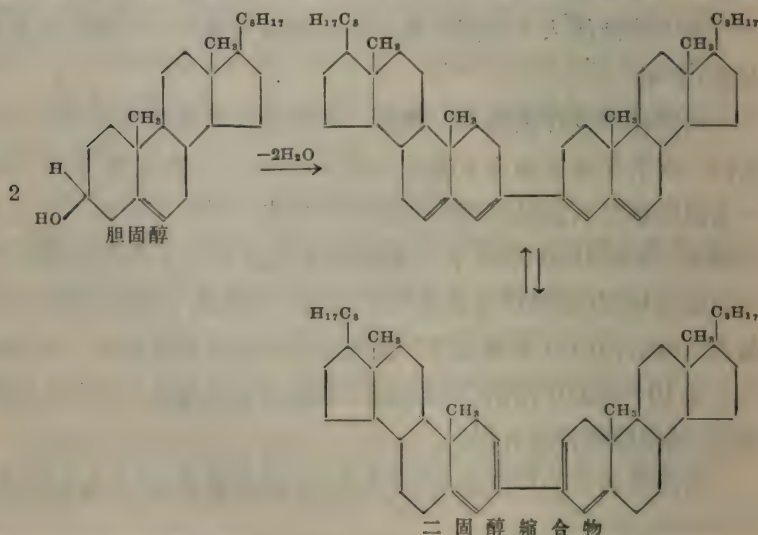
毫升醋酸酐及濃 H_2SO_4 数滴①, 注意顏色变化。参考实验八。

取一干試管加入数滴甘油, 再加无水 CaCl_2 約 0.1 克并在火上慢慢加热。待熔化后, 注意有无刺鼻气味②。

实验八 胆固醇的提取和鉴定

人及动物的各种細胞均含有自由存在的和以結合形式存在的胆固醇。脑髓、精液及皮脂內含量較多。胆石內胆固醇含量有时达90%。胆固醇溶于氯仿、石油醚、苯、热酒精及脂肪中。

在无水条件下, 胆固醇同乙酸酐和濃硫酸作用呈現藍綠色 (Liebermann-Burchard反应)。此反应先出現紅色, 再紫紅色和深綠色。若胆固醇量不多, 立即出現綠色。其反应机制可能是胆固醇在濃硫酸作用下先形成实验式为 $\text{C}_{58}\text{H}_{86}$ 和 $\text{C}_{54}\text{H}_{88}$ 的二胆固醇縮合物, 再与两个或一个硫酸分子結合, 生成紅色物质和綠色物



① 濃硫酸用量不能过多, 否則會出現淺藍色或棕色。

② 由于磷脂量較少, 不能直接用水解滤液做甘油反应, 因此改用純甘油进行鉴定。

质。胆固醇也可用 Salkowski 氏反应来鉴定。在此鉴定方法中只用浓硫酸而不用醋酸酐，结果为红色。其反应机制和 Liebermann-Burchard 反应相似。生成二固醇缩合物的反应见上页⁽²⁾。

有人利用 Liebermann-Burchard 反应作胆固醇的定量测定。

器材 (1)干燥试管及试管架；(2)乳钵；(3)玻璃板(10×10 厘米)；(4)烘箱；(5)小刀；(6)木制小锤；(7)吸量管。

试剂 (1)脑髓(猪、兔或白鼠等)；(2)石膏；(3)新蒸馏的无水氯仿；(4)浓硫酸；(5)醋酸酐。

操作 (1)提取：注意必须用干燥器材。取脑髓 2—3 克，加 2—3 倍重量的石膏。在乳钵中仔细捣碎后，用木锤塗在玻璃板上成一薄层。在 40°C 烘箱中烘干。

用小刀把干片刮到乳钵内。用杵捣碎后，移入大试管。加氯仿 5—6 毫升，并小心振荡试管 5—10 分钟。用氯仿浸湿的滤纸过滤。用滤液做以下呈色反应。

(2)硫酸试验(Salkowski 氏反应)：取 2—3 毫升滤液，加约等量的浓硫酸，并谨慎地混合。澄清后，观察试管内上部(氯仿)出现的红色和下部出现的带绿莹光的黄红色。

(3)醋酸酐-硫酸试验(Liebermann-Burchard 二氏反应)：取 2—3 毫升滤液，加醋酸酐 10 滴及浓硫酸 1—2 滴。逐渐混合。观察最初产生的红色渐变为蓝色，最后呈蓝绿色。若溶液中胆固醇量不多，立即出现绿色。

实验九 粗脂肪的定量测定

索氏(Soxhlet)提取法

本法为重量法，用脂肪溶剂将脂肪提出后称量之。适用于固体和液体样品。通常使用的脂肪溶剂为乙醚或沸点为 35—45°C 的石油醚。索氏提取器为一循环提取装置。用本法提取的脂溶性

物质为脂肪类物质混合物,称为“粗脂肪”,其中含有脂肪、游离脂肪酸、磷脂、酯、固醇、芳香油、某些色素及有机酸等。

称取样品的重量视材料中脂肪含量而定。含量在10%以下者,可称取10—12克。含量在50—60%者,则可称取2—4克。

有人用化学反应法、光折射法和比重法等来测定脂肪含量。参考有关评述⁽³⁾。

器材 (1)索氏提取器; (2)水浴锅; (3)烘箱; (4)脱脂棉花; (5)脱脂滤纸; (6)提取纸斗。

试剂 (1)样品(芝麻、花生、大豆或玉米); (2)无水乙醚。

表 3. 几种干的植物种子和种仁中油脂的百分含量

样 品	含 油 量	样 品	含 油 量
向日葵种籽	23.5—45.0	大豆种籽	10.0—25.0
向日葵种仁	40.0—67.8	油桐种仁	47.8—68.9
蓖麻种籽	45.1—53.5	玉米谷粒	3.0—9.0
蓖麻种仁	50.7—72.0	小麦谷粒	1.6—2.6
芝麻种籽	46.2—61.0	稻子谷粒	1.3—2.4
花生种仁	40.2—60.7	豌豆种籽	0.7—1.9

操作 先将样品置100°C烘箱中烘干。冷后,研成粉末^①。准确地称取一定量样品,放入提取纸斗中^②。样品上用脱脂棉塞严。如无提取纸斗,也可用脱脂滤纸包裹样品。将纸斗或纸包放入索氏提取管内(图2)。注意勿使斗内或包内样品高出提取器的虹吸部分。

① 样品的制备十分重要,应先烘去水分。在烘干时要避免过热。样品颗粒不能太大。研磨后,要用脱脂棉擦拭乳钵,并将此脱脂棉放入提取纸斗中一起提取。还可用小量乙醚洗净乳钵,洗后倒入提取管中。

② 样品如为液体,将一定量体积的样品滴在滤纸上。在60—80°C烘箱内烘干后,装入提取器中提取。

于已知重量的索氏提取瓶内，加无水乙醚至半满^①，然后将提取器的各部连接如图。用灯泡或置水浴上用电炉加热（水浴温度约为40—50℃），切勿用火焰直接加热，也不能用火焰烧水浴。乙醚蒸气由联接管上升至冷凝器，凝结成液体，滴入提取管中。到一定水平后，溶有脂肪之乙醚经虹吸管流入提取瓶。调节水浴温度，使乙醚每小时循环10—20次。提取时间视样品性质而定，通常需14—16小时。

提取完毕后，卸下提取瓶^②。在水浴上蒸馏回收乙醚（避免火焰！）。最后置烘箱中（100℃）烤至恒重。计算样品的粗脂肪百分含量。

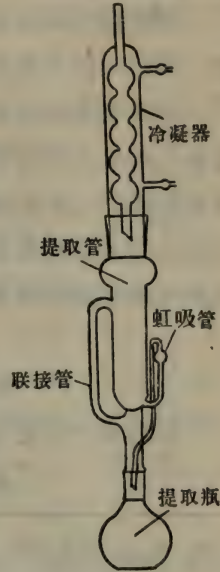


图2. 索氏提取器。

实验十 碘值的测定

脂肪中的不饱和脂肪酸碳链上有不饱和键，可以吸收卤素（ Cl_2 、 Br_2 或 I_2 ）。不饱和键数目越多，吸收的卤素量也愈多。每100克脂肪，在一定条件下，所吸收的碘的克数，称为该脂肪之碘值^③。碘值为鉴别油脂的一个重要常数。

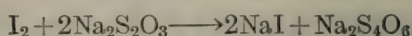
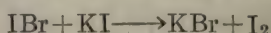
① 一般用沸点在60℃以下的有机溶剂提取。虽然经常使用乙醚，但目前倾向于使用石油醚，因为后者对真脂具有更大的选择性提取。乙醚提取的数值一般偏高，有更多的非脂肪物质也被提取。乙醚和石油醚的联合提取已在食品分析中广泛采用，也有人使用乙醚和乙醇的混合液。

② 提取完毕后，再让乙醚蒸到提取管内。在乙醚达到虹吸管高度前，取下提取瓶，这样可以节省下一步操作时间。

③ 碘值是100克脂肪在一定条件下所吸收的碘的克数。无论使用的是溴化碘溶液或氯化碘溶液，最后都以碘的克数来表示碘值。

从碘值可以知道油脂是否为干性油，并可判断氯化时所需氯量；同时可以用来计算脂肪或脂肪酸的定量组成⁽⁴⁾。

由于碘和脂肪的加合作用很慢。氯或溴和脂肪反应虽快，但有取代和氧化等副反应。因此，普通用溴化碘(Hanus氏溶液)⁽⁵⁾或氯化碘(Wijs氏溶液)⁽⁶⁾。本实验应用 Hanus 氏溶液^①。溴化碘的一部分与脂肪起加合作用后，测量剩余的一部分。使剩余的溴化碘与碘化钾作用放出碘。放出碘的多少用硫代硫酸钠滴定之。



取样多少决定于油脂样品的碘值。参考表 4 和表 5。

表 4. 样品的最适量和碘值关系

碘 值	样品克数	作用时间 (小时)	碘 值	样品克数	作用时间 (小时)
30 以下	約 1.0	0.5	100—140	0.2 —0.3	1.0
30— 60	0.5—0.6	0.5	140—160	0.15—0.26	1.0
60—100	0.3—0.4	0.5	160—210	0.13—0.15	1.0

表 5. 几种油脂的碘值

名 称	碘 值	名 称	碘 值
亚麻子油	175—210	花生油	85—100
魚肝油	154—170	猪油	48— 64
棉子油	104—116	牛油	25— 41

有关碘值测定法的历史和近况，参阅参考书目^(7,8)。

器材 (1)300 毫升碘值测定瓶(或带玻璃塞的锥形瓶)；(2)10 毫升量筒；(3)50 毫升滴定管；(4)吸量管。

试剂 (1) Hanus 氏溶液^[15]；(2)标准 0.1N 硫代硫酸钠溶

① 用 Hanus 法所得的碘值比 Wijs 法测得的低 2—5%。但 Hanus 试剂比 Wijs 试剂稳定，所以采用较广泛。

液^[16]；(3)純四氯化碳；(4) 1%淀粉溶液（溶于飽和氯化鈉溶液中）；(5)10%碘化鉀溶液；(6)花生油或猪油。

操作 准确地称量約 0.1 克蓖麻油(或約 0.5 克猪油) 2 份。置于两个干燥的碘值测定瓶(图 3)內，切勿使油粘在瓶頸或壁上。加純四氯化碳 5 毫升，輕輕振動，使油溶解。用滴定管仔細地加 Hanus 氏溶液 15 毫升(准确)，勿使溶液接触瓶頸。塞好玻璃塞，在玻璃塞与瓶口之間加 10%碘化鉀溶液数滴封閉縫隙，以免碘的揮发損失。在 20—30°C 暗处放置 30 分钟，并不时輕搖。油吸收的碘量不应超过 Hanus 氏溶液所含之碘量的一半^①。若瓶內混合物之顏色很淺，表示油用量过多。改称較少量油，重作。



图 3. 碘值测定瓶。

放置 30 分钟后^②，立刻小心地打开玻璃塞，使塞旁碘化鉀溶液流入瓶內，切勿丢失。用新配制的 10%碘化鉀 10 毫升和蒸餾水 50 毫升把玻璃塞上的和瓶頸上的液体冲入瓶內，混匀。用 0.1N 硫代硫酸鈉溶液迅速滴定至淺黃色。加入 1%淀粉約 1 毫升，繼續滴定。将近終点时，用力振蕩^③，使碘由四氯化碳全部进入水溶液內。再滴至藍色消失为止，即达滴定終点^④。

另作 2 份空白对照，除不加油样品外，其余操作同上。滴定后，將廢液倒入廢液瓶，以便收回四氯化碳。計算碘值。

① 卤素的加合反应是一可逆反应，因此，只有当試剂絕對过量时，才使反应进行較完全。

② 放置時間，一般規定碘值在 110 以下者为 30 分钟，更高的則放置 1 小时。

③ 用力振蕩是本滴定成败的关键之一，否則容易滴过头或不足。如果振蕩不够，四氯化碳层会有紫色或紅色。此时需用力振蕩使碘进入水层。

④ 一些時間后，滴定液应返回藍色，否則就表示滴定过量。

参考书目

- (1) Witzman, E. J., J. Am. Chem. Soc., **36**, 1766(1914).
- (2) Rapoport, S. M. und Raderecht, H. J., Physiologisch-Chemisches Praktikum, p. 124—125, Veß verlag Technik, (1956).
- (3) Progresses in Chemistry of Fats and Other Lipids, Editors: Holman, R. T., Lundberg, W. O. and Malkin, T., Vol. V, p. 4—7(1958).
- (4) 季諾維耶夫, A. A., 油脂化学, 286 頁.
- (5) Hanus, J., Z. Nahr. Genussmitt., **1**, 913(1901).
- (6) Wijs, J. J., J. Soc. Chem. Ind., **17**, 698(1898).
- (7) 如(3), p. 25.
- (8) Leach, A. E., Food Inspection and Analysis, John Wiley and Sons Inc., New York(1920).

第三章 蛋白质的化学

蛋白质是一切生活細胞和有机体的最重要的和最必需的組成成分。它們构成人体及所有动物机体組織干物质的主要部分，是生命現象的主要承担者。

蛋白质是复杂的高分子化合物，分子量从几万到几百万，溶于水时成亲水胶体溶液。蛋白质是由 20 余种氨基酸以肽鍵相互连接而成的。在酸、碱和特殊的酶(蛋白酶)作用下，蛋白质水解而成肽、腓、肽，并最后形成氨基酸。

蛋白质分子中既含有羧基，又含有氨基等酸碱基团，因而是酸碱两性化合物。在特定的 pH 条件下，蛋白质酸性基团的解离度与碱性基团的解离度相等，分子成为带有正負电荷相等的中性形式，在电场中不向两极移动。此 pH 值称为該蛋白质的等电点。处于等电点的蛋白质溶液不稳定，蛋白质极易沉淀析出。

蛋白质分子依靠氢鍵、盐鍵等副价鍵維持一定的空間构形。其空間結構易受各种物理化学因素影响，結果氢鍵等副价鍵破裂，它們的物理化学性质和生物学活性也随之改变。此現象称为蛋白质的变性。

許多物理化学因素可以改变蛋白质在水中的溶解度，产生可逆或不可逆沉淀。这些物理化学因素常用来分离、提純和除去蛋白质。

蛋白质按其分子組成可分为两大类：(1)分子完全由氨基酸构成的簡單蛋白质，如卵清清蛋白等；(2)分子由簡單蛋白质与非蛋白质輔基构成的結合蛋白质，如核蛋白、血紅蛋白等。

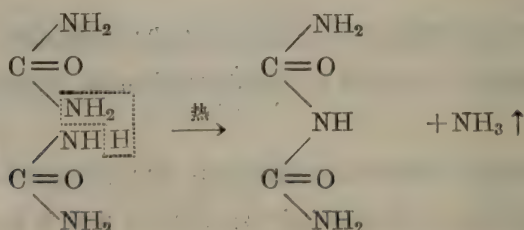
实验十一 蛋白质与个别氨基酸的呈色反应

蛋白质所含的特殊氨基酸或特殊结构，可与某些试剂发生反应，生成有颜色的物质。这些反应非常灵敏，常作为蛋白质或氨基酸定性和定量测定的根据。由于化学结构与氨基酸成分之不同，一种蛋白质未必能起所有蛋白质的颜色反应。氨基酸本身和具有与蛋白质同样结构的非蛋白质物质也呈相应的某些颜色反应。

器材 (1) 试管及试管架；(2) 10毫升量筒；(3) 喷雾器。

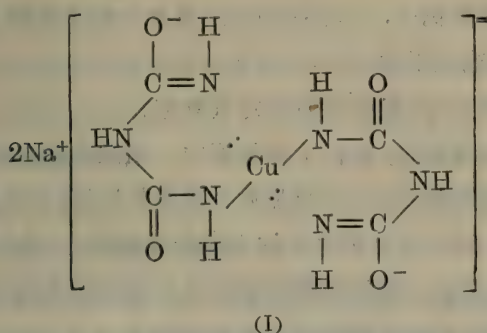
试剂 (1) 蛋白质溶液^[17]；(2) 未稀释的鸡蛋白溶液；(3) 1% 白明胶溶液；(4) 尿素粉末；(5) 1% 硫酸铜溶液；(6) 0.5% 醋酸铅溶液；(7) 10% 氢氧化钠溶液；(8) 20% 氢氧化钠溶液；(9) 0.5% 石炭酸溶液；(10) 浓硝酸；(11) 浓硫酸；(12) 浓醋酸（经常混有乙醛酸）；(13) Millon 氏试剂^[18]；(14) 1% 茚三酮溶液；(15) 精氨酸溶液 10 毫克/毫升；(16) 组氨酸溶液 10 毫克/毫升；(17) 20% NaOH；(18) 1% α -萘酚酒精溶液；(19) 次溴酸钠溶液^[19]；(20) 重氮试剂^[20]；(21) 1% 鸡蛋清溶液；(22) 1% 甘氨酸溶液；(23) 0.3% 半胱氨酸溶液；(24) 5% 亚硝酰铁氰化钠溶液；(25) 饱和硫酸钠溶液；(26) 浓氢氧化铵。

(1) 双缩脲反应：当尿素加热时，两分子尿素缩合放出一分子氨而形成双缩脲：



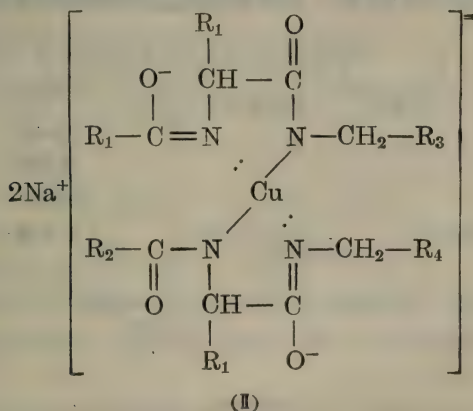
双缩脲在碱性溶液中与 Cu^{++} 结合生成紫红色的复杂化合物 (I)。

这一呈色反应称为双缩脲反应。



在蛋白质分子中含有多个与双缩脲结构相似的肽键，因此也能呈双缩脲反应，形成紫红色或蓝紫色的复合物(II)。复合物(II)的数量越少，颜色越红。双缩脲反应不仅为含有两个以上肽键的物质(蛋白质和三肽以上的多肽)所有，而含有一个肽键和一个—CS—NH₂、—CH₂—NH₂、—CRH—NH₂、CH₂—NH₂—CHNH₂—、—CH₂OH 或—CHOHCH₂NH₂等基团的物质以及乙二酰二胺

$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \\ | \quad | \\ \text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{O} \end{array}$
 (O=C—C=O)等物质也有此反应^(1,2)



过量铵盐(如硫酸铵)干扰此反应, 因为 NH_4^+ 能与 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 形成暗蓝色的络离子, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{++}$ 。多加一些 NaOH 在一定范围内, 可以克服这一干扰。

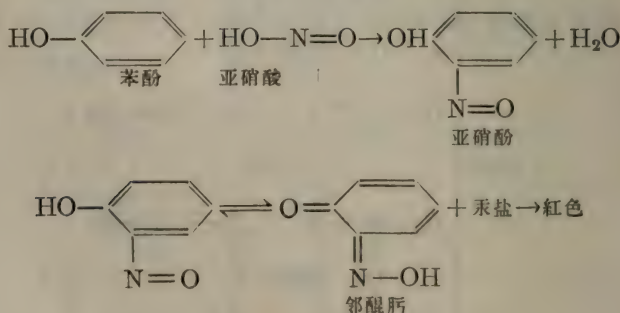
双缩脲反应, 可用作蛋白质定量测定。

取少许尿素结晶, 放在干燥试管中。用微火加热使尿素溶解。溶解的尿素开始硬化时, 停止加热。尿素放出氨, 形成双缩脲。

冷后, 加 10% 苛性钠溶液约 1 毫升并振荡之, 再加 1% 硫酸铜溶液 1 滴, 再振荡。观察出现的粉红色。避免添加过量硫酸铜, 否则, 生成的蓝色氢氧化铜能掩盖粉红色^①。

向另一试管加蛋白质溶液约 1 毫升和 10% 氢氧化钠溶液 2 毫升。摇匀。再加 1% 硫酸铜溶液两滴, 随加随摇。观察紫玫瑰色出现。

(2) 米伦氏反应: 1849 年 Millon⁽³⁾ 氏发现, 一些蛋白质与汞的浓硝酸溶液一起加热时产生颜色, 并认为是酪氨酸和其他酚类化合物发生此反应。单酚衍生物与米伦氏试剂作用生成粉红色到暗红色, 双酚和吡啶衍生物(如色氨酸)生成黄色到红色。此反应的化学过程还未完全了解, 最初产生的有色物质可能是酚的亚硝基衍生物, 经变位作用, 成为颜色更深的邻醌肟。最终具有稳定红色之产物, 成分尚不明了。有人曾用此法作酪氨酸的定量测定⁽⁴⁾。



① 为了防止生成蓝色氢氧化铜, 有人在双缩脲试剂中加入一些乙二醇或甘油。

組成蛋白质之氨基酸中只有酪氨酸为一羥苯衍生物。因此，凡含有酪氨酸的蛋白质均呈此反应。

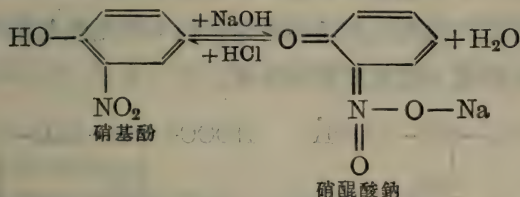
Millon 氏反应不能用来检查尿中蛋白质。尿中无机盐可将试剂中汞离子沉淀，使试剂失效。碱也能沉淀汞离子，因此鉴定碱性溶液时，須先加酸酸化。

取石炭酸(苯酚)3滴，置于試管内并加 Millon 氏試剂約 1.5 毫升。小心加热，并观察顏色变化。

向試管中加蛋白质溶液 2 毫升^①及 Millon 氏試剂約 0.5 毫升。因为試剂中含汞盐及硝酸，蛋白质凝固沉淀。將試管内容物小心加热^②，沉淀变成磁紅色。避免添加过量的 Millon 氏試剂，因为試剂中含有硝酸，能与許多蛋白結合，产生黄色(蛋白质黄色反应)，干扰 Millon 氏反应(这是关键)。

用白明胶作 Millon 氏反应。如白明胶很純，則反应不出現，因为白明胶不含酪氨酸。

(3)蛋白黄色反应: Salkowski 在 1888 年第一次应用这一反应⁽⁵⁾。它是含有芳香族氨基酸，特别是含有酪氨酸和色氨酸的蛋白质所特有的呈色反应。在此反应中，硝酸將蛋白质分子中的苯核硝化，产生黄色或橙黄色硝基衍生物。苯核上含有羥基，加碱則顏色变深。这可能由于硝醌酸根的生成所致。



① 此試驗可应用于不溶性蛋白。加 1 毫升試剂于蛋白质中，逐渐加热，則出現粉紅到紅色(决定于酪氨酸的含量)。对于水溶性的豚、胰，則溶液变紅，表示有酪氨酸存在。

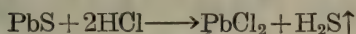
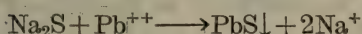
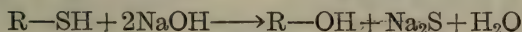
② 加热要慢。加热过快，顏色往往看不清楚。

硝酸根、亚硝酸根、氯酸根及过多的氯离子均能妨碍此反应。有微量硫酸铜或 Fe^{+++} 离子存在时，可以加强色氨酸的阳性反应⁽¹³⁾。关于 Hopkins-Cole 反应，Harvey、Miller 和 Robson 作了全面的讨论⁽¹⁴⁾。

向试管中加数滴未稀释的鸡蛋白溶液，再加浓醋酸（常含少量乙醛酸）约 1 毫升。倾斜试管，谨慎地沿管壁加浓硫酸^①约 1 毫升，使其重迭，勿使两者混合。静置后，观察在两液界面上出现的红紫色环^②。

用白明胶作乙醛酸反应。白明胶分子中无色氨酸，所以不呈此反应。

(5) 蛋白质中硫的反应(胱氨酸和半胱氨酸)：蛋白质分子中常有含硫的胱氨酸和半胱氨酸。含硫蛋白质在强碱作用下，分解形成硫化钠，后者与醋酸铅作用形成黑色硫化铅沉淀。若加入浓 HCl ，则出现 H_2S 的臭味。



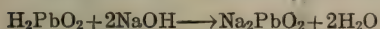
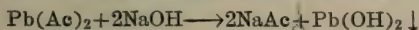
蛋白质中的胱氨酸和半胱氨酸极易脱硫，而含硫的蛋氨酸对强碱相当稳定，不产生此反应。

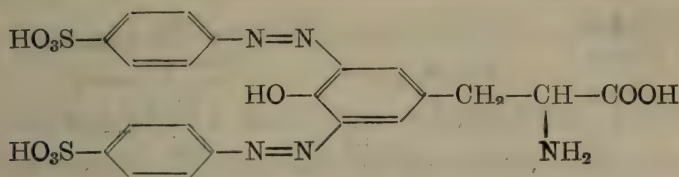
向试管中先加 0.5% 醋酸铅溶液约 1 毫升，然后慢慢滴加 10% 氢氧化钠溶液，直到产生的沉淀溶解为止^③。摇匀后，再加未稀释

① 硫酸必须是纯的。

② 有时颜色不易形成，可以在水浴中微热。

③ 醋酸铅先与 NaOH 作用形成 $\text{Pb}(\text{OH})_2$ 白色沉淀，它是两性物质，当加入过量的 NaOH 时，与 NaOH 发生反应，形成铅酸钠而溶解。





Kappeller-Adler 对此法作了综述⁽¹⁵⁾。

取 2 支试管, 分别加入组氨酸溶液和鸡蛋白溶液(稀释 20 倍) 1 毫升, 各加入新配制的重氮试剂^① 1 毫升, 摇匀。加入 1 毫升 20% NaOH, 再摇匀。过几分钟, 观察颜色的形成。一般出现樱桃红色。

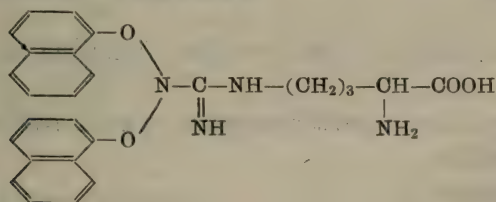
(8) 坂口氏反应 (Sakaguchi 反应): 1925 年 Sakaguchi⁽¹⁶⁾ 观察到精氨酸与 α -萘酚在碱性次氯酸钠溶液中发生反应, 产生红色的产物。次溴酸钠与次氯酸钠一样有效, 且比较方便。许多胍代化

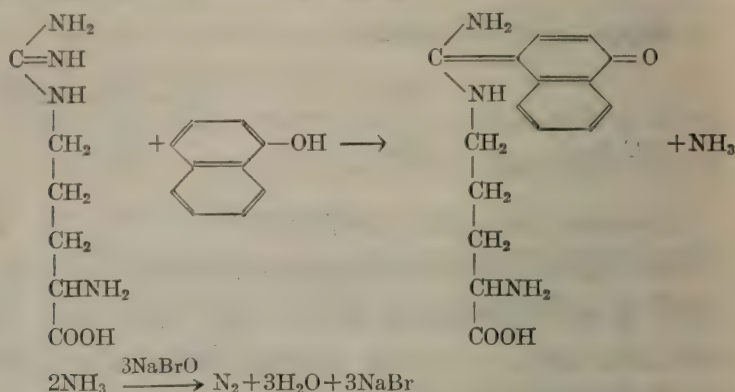
合物, 如胍乙酸、甲胍 $\left(\text{CH}_3\text{NHC} \begin{array}{c} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{array} \right)$ 、胍基丁胺等也发生此反

应。精氨酸是唯一呈正反应的氨基酸, 反应灵敏度达 1:250,000。反应方程式如下^{(17)②}:

① 偶氮试剂放置不能超过一昼夜, 否则失效。A、B 两种母液, 则在半年内稳定。

② 有人⁽¹⁸⁾认为, 产生的颜色物质是:



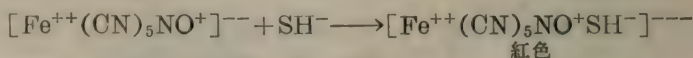


生成的氨可被次溴酸钠氧化成氮。在次溴酸钠缓慢作用下，有色物质继续氧化。 α -氨基断裂，引起颜色消失，因此过量的次溴酸钠对反应不利。加入浓尿素，破坏过量的次溴酸钠，增加颜色的稳定度。酪氨酸、组氨酸、色氨酸和氨能减低产生颜色的强度，甚至阻止颜色的形成。

此反应可以用来定性鉴定含有精氨酸的蛋白质和精氨酸的定量测定⁽¹⁹⁾。

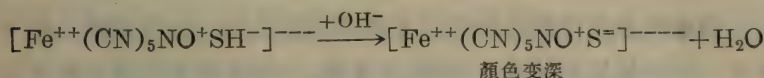
取 2 支试管，分别加入 1 毫升精氨酸溶液和鸡蛋白溶液，各加 20% NaOH 5 滴，1% α -萘酚酒精溶液 2 滴及次溴酸钠溶液 6 滴。摇匀，放置片刻，注意出现颜色^①。

(9) 巯基的呈色鉴定：这一反应是—SH 产生的。在碱性条件下，含有一SH 的化合物如半胱氨酸^②与亚硝基铁氰化钠反应形成紫红色物质。胱氨酸被 KCN 还原成半胱氨酸后，也呈正反应。反应式如下⁽²⁰⁾。



① 应避免加入过量的 α -萘酚和次溴酸钠溶液。前者过量，溶液易呈棕色，后者过量，则反应物迅速退色。

② H_2S 也能发生反应。

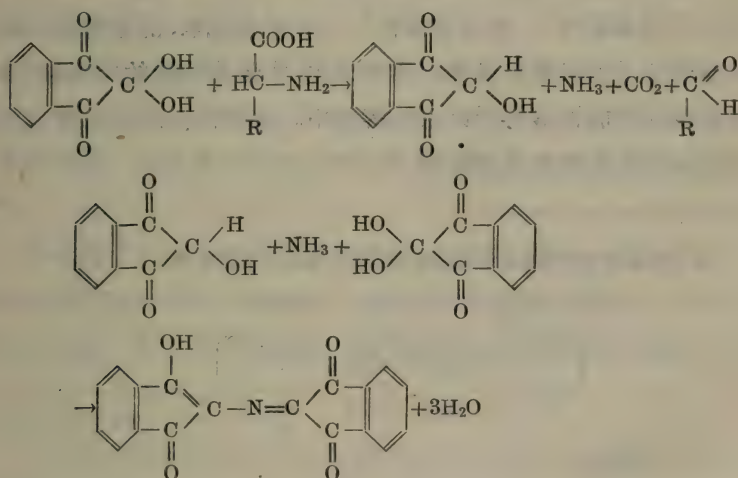


(1)在滴点反应板上,混合2滴0.3%半胱氨酸溶液,3滴10% NaOH,0.5毫升5%亚硝基铁氰化钠溶液^①。观察出现紫红色。颜色容易消退。

(2)向3毫升鸡蛋白溶液,加入3毫升饱和硫酸铵、2—3滴5%亚硝基铁氰化钠。并加入饱和氢氧化铵碱化。观察出现的紫红色。

(10)茚三酮反应: 此反应是所有氨基酸共有的反应。反应十分灵敏,1:1500,000的氨基酸水溶液即能发生反应。Ruhemann^(21,22)在1910年首次用它来鉴定氨基酸。反应在pH 5—7溶液中进行最好。

氨基酸与茚三酮的反应分为两个步骤,第一步是氨基酸被氧化形成 CO_2 、 NH_3 和醛,茚三酮被还原成还原型茚三酮;第二步是所形成的还原型茚三酮同另一个茚三酮分子和 NH_3 缩合生成有色物质。



① 注意亚硝基铁氰化钠有毒。

脯氨酸与茚三酮反应产生不很强的黄色^①。 β -丙氨酸、氨和许多一级胺都呈正反应。尿素、马尿酸、二酮吡嗪和肽键上的亚氨基不呈现此反应。

此反应已发展成氨基酸定量测定法。我们可以用比色法测定反应生成的颜色的深浅⁽²³⁾，或者用气量法⁽²⁴⁾测定生成的二氧化碳的多少。

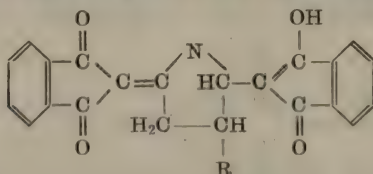
(1)取 2 支试管，分别加入 4 毫升 2% 酪蛋白溶液和 $M/10$ 甘氨酸溶液，再各加 1 毫升 0.1% 茚三酮溶液，混匀。至沸水浴中加热 3—5 分钟，放置冷却。出现粉红、紫红到蓝色。

(2)在一块滤纸片上滴加 2 滴 $M/10$ 甘氨酸溶液，在 60°C 烘箱中烘干。用 0.1% 茚三酮酒精溶液喷湿，再烘干。观察出现的紫红色斑点。

实验十二 蛋白质的可逆沉淀

与其他胶体溶液相似，蛋白质溶液不稳定。在多种物理的和化学的因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷或脱水，沉淀析出。此时蛋白质分子并未发生显著的化学变化，将致使沉淀的因素除去时，蛋白质沉淀能再溶解于原来的溶剂中。这种沉淀反应，称为可逆沉淀反应或不变性沉淀反应。

① 脯氨酸和羟脯氨酸的黄色反应产物可能是下列物质⁽²⁵⁾。



脯氨酸, $R=H$

羟脯氨酸, $R=OH$

用中性盐盐析蛋白质和低温下用乙醇或丙酮短时间处理蛋白质而使其沉淀的反应,均为可逆沉淀反应。

器材 (1) 試管及試管架; (2) 小漏斗。

試剂 (1) 蛋白质氯化鈉溶液^[21]; (2) 蛋白质溶液^[17]; (3) 硫酸銨飽和溶液; (4) 硫酸銨結晶粉末; (5) 氯化鈉結晶粉末; (6) 1% 醋酸; (7) 95% 乙醇。

(1) 蛋白质的盐析作用: 于蛋白质溶液中, 加中性盐至一定濃度, 蛋白质即被沉淀析出。这种作用叫做盐析。盐析的机制不甚明了, 可能因为: (1) 蛋白质分子所带之电荷被中和; (2) 蛋白质分子被盐脫去水化层。沉出的蛋白质化学性质未变, 减低盐的濃度时, 仍能溶解。

用一种盐来进行盐析时, 不同蛋白质需要的濃度不同, 这样可以进行蛋白质分級盐析。例如, 向含有清蛋白和球蛋白的鸡蛋白溶液中加入硫酸鎂或氯化鈉至飽和, 或加硫酸銨至半飽和, 則球蛋白^①沉淀析出。在等电点时, 清蛋白可被飽和硫酸鎂或氯化鈉或半飽和硫酸銨溶液沉淀析出。

于試管内, 加蛋白质氯化鈉溶液^②和飽和硫酸銨溶液各 5 毫升, 并混合之。靜置数分钟, 观察析出的球蛋白沉淀。將試管内容物过滤, 向滤液中添加硫酸銨粉末至飽和, 清蛋白沉淀析出^③。

另取試管 1 支, 加蛋白质氯化鈉溶液約 3 毫升。向試管内添加氯化鈉粉末至飽和, 数分钟后, 观察析出的球蛋白沉淀。將試管内容物过滤。向滤液內添加稀醋酸半滴至一滴, 使滤液呈弱酸性,

① 包括各种 α 、 β 和 γ 球蛋白。

② 本实验有的用蛋白质氯化鈉溶液, 有的用蛋白质溶液, 蛋白质氯化鈉溶液中含有球蛋白和清蛋白, 在蛋白质溶液中球蛋白已沉淀除去。

③ 硫酸銨一定要加足量, 否則, 不出現沉淀。

有清蛋白沉淀析出^①。

(2)用乙醇沉淀蛋白质: 蛋白质不溶于中性有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮等)。因此,如果向蛋白质水溶液中添加乙醇,至一定浓度时,则产生蛋白质沉淀。此时溶液应为中性或弱酸性。沉淀不同蛋白质所需要的乙醇的浓度不同,乙醇能使蛋白质胶体颗粒脱水,因而降低其在溶液中的稳定性。溶液中如有少量中性盐(例如氯化钠)沉淀的形成更加迅速而完全。

如将所得蛋白质沉淀和乙醇迅速分离,则仍能在水中溶解。这说明沉淀出来的蛋白质性质未变,这种沉淀是可逆的。但若在乙醇中放置时间较长,则蛋白质变性而不再溶于水。

在2支试管中,各加入2滴未稀释的鸡蛋白和1毫升水,有沉淀形成(什么物质?)。加一滴饱和硫酸铵,溶液变清亮(为什么?)。各加1毫升冷酒精,摇匀,立刻在一管中加入10毫升蒸馏水,摇匀。半小时后,向另一管中加入10毫升蒸馏水,摇匀。比较两管的混浊度,并解释之^②。

实验十三 蛋白质的不可逆沉淀

许多物理和化学因素可使蛋白质发生不可逆沉淀。在不可逆沉淀反应中,蛋白质已变性,不能再溶解于原来的溶剂中。变性蛋白质分子的内部构造发生改变,暴露出大量憎水基团,蛋白质变为憎水胶体。重金属盐、植物碱试剂、无机酸、光、热、震荡和超声波均能使蛋白质发生不可逆沉淀而析出。

器材 (1)试管及试管架;(2)玻璃棒。

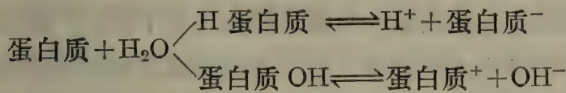
试剂 (1)蛋白质溶液^[17];(2)0.5%醋酸铅溶液;(3)饱和和

① 加醋酸要适量,否则得不到沉淀。另外加的氯化钠量一定要达到饱和。

② 卵清蛋白极易被酒精变性。因此在本实验中即使是立刻稀释,也可能有部分清蛋白变性而使溶液混浊。

0.1%硫酸铜溶液; (4)3%硝酸银溶液; (5)0.5%升汞溶液; (6)苦味酸饱和溶液; (7)鞣酸饱和溶液; (8)1%醋酸; (9)碘化钾-碘化汞溶液^[22]; (10)10%盐酸; (11)5%亚铁氰化钾溶液; (12)浓盐酸; (13)浓硝酸; (14)浓硫酸; (15)15%三氯醋酸; (16)20%磺基水杨酸溶液。

(1)重金属盐沉淀蛋白质: 蛋白质在水溶液中是酸碱两性物质, 可用下列方程式表示



在碱性溶液中蛋白质解离成蛋白质负离子。蛋白质负离子能与带正电荷的金属离子结合成蛋白质盐。如果形成的盐难溶于水, 则蛋白质沉淀析出。在有机体内, 蛋白质常以其可溶性的钠盐或钾盐的形式存在。当加入汞、铅、铜、镉、锌等重金属盐时, 则蛋白质形成不溶性的汞、铅、锌、铜、镉等蛋白质盐。重金属盐沉淀蛋白质往往引起蛋白质变性。

重金属盐类沉淀蛋白质的反应通常很完全(特别是有碱金属盐类存在时)。因此, 在生化分析上, 常用重金属盐除去液体中的蛋白质(同理, 可用蛋白质解除重金属盐食物性中毒)。但应注意, 使用某些重金属盐沉淀蛋白质时, 例如用醋酸铅或硫酸铜时, 不可过量, 否则引起沉淀的再溶解^①。

取4支试管, 各加蛋白质溶液2毫升, 然后小心地分别滴加以下4种试剂各数滴。向第1试管滴加0.5%醋酸铅溶液, 第2试管滴加0.1%硫酸铜溶液, 第3试管滴加3%硝酸银溶液, 第4试管滴加0.5%升汞溶液(毒物!)。观察沉淀的生成。

① 有人认为, 这种再溶解现象是由于过量的金属离子被蛋白质选择吸附, 从而使蛋白质带上同种电荷, 相互排斥而溶解。加入过量的NaCl可以使蛋白质汞盐沉淀溶解的道理, 同上。

在第 1 和第 2 两个試管中，分別滴加过量醋酸鉛和飽和硫酸銅溶液，观察沉淀的溶解。

(2)植物碱試剂沉淀蛋白质：鞣酸、苦味酸、 KI-HgI_2 、 $\text{H}_4\text{Fe(CN)}_6$ 、 KI-BiI_3 等植物碱試剂能和蛋白质結合生成沉淀。蛋白质和植物碱含有相似的含氮基团，这可能是植物碱試剂也能沉淀蛋白质的原因。在制革工业中，常用鞣酸来鞣革。在医药中，用苦味酸药膏来沉淀伤口外渗的血浆蛋白。

植物碱試剂沉淀蛋白质作用需在酸性环境下进行。碱性环境能溶解沉淀。因为在此反应中，蛋白质以正离子形式与試剂的負离子发生反应，形成不溶性复合物。

取 2 支試管，各加約 2 毫升蛋白质溶液。滴加少量 1% 醋酸溶液使成酸性。向一試管添加飽和鞣酸溶液数滴，另一試管添加苦味酸飽和溶液数滴。观察蛋白质沉淀。

另取 1 支試管，注入約 2 毫升蛋白质溶液，用 1% 醋酸溶液使成酸性。滴加 5% 亚铁氰化鉀溶液。在每加一滴之后，振蕩，观察蛋白质的沉淀。

再取一支試管加蛋白质溶液約 2 毫升。加 10% 盐酸使呈微酸性，而后添加数滴碘化鉀-碘化汞溶液。观察蛋白质沉淀。

(3)用矿酸沉淀蛋白质：濃矿酸类(H_3PO_4 除外)能使蛋白质发生不可逆的沉淀反应。这种沉淀作用可能是蛋白质顆粒脫水的結果。除硝酸外，过量的矿酸能溶解沉出的蛋白质。

用硝酸沉淀蛋白质的反应特別重要。在临床診斷上常用以檢查尿中蛋白质。

取 3 支試管，分別加入濃盐酸、濃硫酸和濃硝酸各約 1 毫升。小心地向 3 支試管中各注入蛋白质溶液約 1 毫升。观察两种液体界面处有白色环状蛋白质沉淀出現。

小心振蕩每个試管。蛋白质沉淀应在过剩的盐酸及硫酸中溶

解(有时盐酸不足,再多加些)。在含硝酸的試管中,虽經振蕩,蛋白质沉淀亦不溶解。

(4)用有机酸沉淀蛋白质: 有机酸能使蛋白质沉淀。不同的有机酸对蛋白质的沉淀效应不同,三氯乙酸和磺基水楊酸最有效,能将生物体液中的蛋白质(例如血清中的蛋白质)完全除去,因而广泛地被使用。如拟除掉滤液中的三氯醋酸,可将滤液煮沸。三氯醋酸分解成氯仿和二氧化碳而挥发。

取試管 2 支,各加入蛋白质溶液約 2 毫升。分別滴加 15% 三氯醋酸溶液和 20% 磺基水楊酸溶液各数滴。观察蛋白质的沉淀。

(5)加热沉淀蛋白质: 几乎一切蛋白质都加热而凝固。不同蛋白质的凝固温度不同,有一些蛋白质在 50—55°C 即凝固,另一些蛋白质却能經受短暫的煮沸而不凝固。

在凝固时,蛋白质变性,变成不可逆的不溶状态。加热变性蛋白质的分子构造发生改变,失去天然蛋白质的一些性质。变性反应与加热時間并進,但随温度升高而急剧地加速。极短时间的加热可能不引起蛋白质凝固。

盐类的多少及氢离子浓度对蛋白质加热凝固有重要影响。当蛋白质处于等电点时,加热凝固最完全和最迅速。少量盐类有助于蛋白质的加热凝固。

在酸性溶液內,蛋白质胶粒带有正电荷。在碱性溶液中,蛋白质胶粒带負电荷。在这两种情形下,蛋白质溶液加热不凝固。若同时溶液中有足量的某些中性盐,也能凝固。

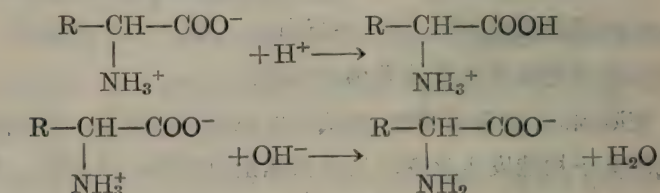
取 5 支試管,各加蛋白质溶液約 2 毫升。将第 1 支試管加热。观察蛋白质凝固沉淀。在第 2 支試管內加入 1% 醋酸 1 滴再加热^①。蛋白质凝固沉淀較迅速和較完全。在第 3 支試管中加約 0.5 毫升

① 注意不要多加醋酸,有时只要半滴即可,过多会得到相反結果。

10%醋酸并加热。观察有无沉淀。在第4支试管中加入约0.5毫升10%醋酸和几滴饱和氯化钠溶液。加热,观察蛋白质沉淀,并与第3支试管比较。在第5支试管内,加入约0.5毫升氢氧化钠溶液并加热。观察并解释结果。分别用碱和酸中和第4和第5支试管的溶液,结果沉淀析出,为什么?

实验十四 蛋白质等电点的测定

蛋白质分子为两性电解质,含有自由氨基、羧基和酚基、—SH基、胍基、咪唑基等酸碱基团。在酸性溶液中蛋白质变成阳离子,在碱性溶液中,游离成阴离子:



在一定氢离子浓度时,蛋白质分子的酸性解离与碱性解离相等,成为中性颗粒,所带正负电荷数目相等;在电场内,蛋白质既不向阴极移动,也不向阳极移动。这时的pH值,称为蛋白质的等电点。蛋白质等电点多接近于pH 7.0。略偏酸性的等电点也很多,如白明胶的等电点为pH 4.7。也有偏碱性的,如精蛋白等电点为pH 10.5—12.0。在等电点时,蛋白质溶解度最小,容易沉淀。

器材 (1)试管及试管架;(2)微量刻度吸量管;(3)10毫升刻度吸量管。

试剂 (1)0.1N 醋酸钠溶液;(2)0.1N 醋酸;(3)1N 醋酸;(4)1%白明胶溶液;(5)95%乙醇;(6)酪蛋白-醋酸钠溶液^[23]。

(1)白明胶等电点的测定①: 白明胶易溶于水。同其他pH比

① 在本实验和下一个实验中,量取各种溶液必须准确。

較, 在等電點時, 適量的酒精能將白明膠沉淀析出。

操作 取 6 支試管并標號, 按下表添加試劑。

試 劑	試 管 號 碼					
	1	2	3	4	5	6
0.1N 醋酸鈉溶液(毫升)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
0.1N 醋酸	0.25	0.50	1.0	2.0	4.0	—
1N 醋酸	—	—	—	—	—	0.80
蒸餾水	3.75	3.5	3.0	2.0	—	3.2
1%白明膠溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
pH	5.6	5.3	5.0	4.7	4.4	4.1

振蕩混勻各試管內容物。向第 4 號試管內, 用吸量管慢慢滴加乙醇, 直至出現輕微混濁為止。隨加隨搖, 不可多加。約需 8 毫升。按照第 4 號試管的乙醇用量, 向其餘 5 個試管準確地添加同量乙醇。10 分鐘和 30 分鐘後, 觀察比較各管的混濁度, 并作表, 用—、±、+、++、+++等符號來表示各管的混濁度。指出白明膠的等電點。

(2) 酪蛋白等電點的測定: 酪蛋白在等電點時的溶解度很低。牛乳變酸後產生的沉淀即為酪蛋白在等電點沉淀析出的現象。

操作 取 9 支試管并標號, 按下表添加試劑。

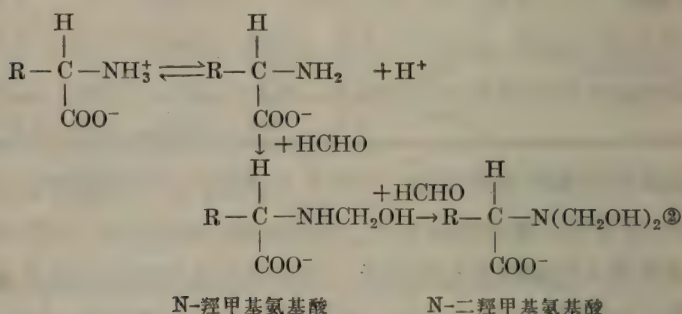
試 劑	試 管 編 號								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蒸餾水(毫升)	8.38	7.75	8.75	8.5	8	7	5	1	7.4
0.01N 醋酸	0.62	1.25	—	—	—	—	—	—	—
0.1N 醋酸	—	—	0.25	0.5	1	2	4	8	—
1.0N 醋酸	—	—	—	—	—	—	—	—	1.6

向各管各加入 1 毫升酪蛋白-醋酸鈉溶液, 振蕩混勻。注意比較搖勻時及經過 10 分鐘之後各管的混濁度, 并作表。用—、±、+、

++、+++等符号来表示各管的混浊度。指出酪蛋白的等电点。

实验十五 Sørensen 氏甲醛滴定法

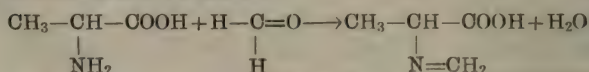
蛋白质和氨基酸的 $-\text{NH}_3^+$ 的 pK 值常在9.0以上,不能用一般酸碱指示剂(包括酚酞)作滴定测量^①。但可用Sørensen氏的甲醛滴定法测量⁽²⁶⁾。用甲醛处理氨基酸,甲醛与氨基结合,



结果使滴定曲线向酸性方向移动,移动的多少决定于溶液中的甲醛浓度^③。当滴定终点移至 pH 9左右时,即可用酚酞作指示剂,用碱来滴定 $-\text{NH}_3^+$ 上的 H^+ 。如蛋白质或氨基酸分子中的 $-\text{NH}_3^+$ 基数目与 COO^- 基相等,甲醛滴定所滴定的虽然是氨基,也可以说是羧基。如果 $-\text{NH}_3^+$ 基和 COO^- 基的数目不相等,甲醛滴定的结果不能代表羧基。

① 为了复习酸碱滴定原理和选择指示剂原理,建议先作后边的甲醛滴定补充实验。

② 早先认为形成次甲基氨基酸,



现在知道是形成N-羟甲基氨基酸,并没有水释放出来。

③ 甲醛的浓度很重要,浓度不足会使数值过低,因为终点没有提到 pH 9左右。最好使甲醛的浓度在滴定完成时达6—9%。

甲醛滴定法简单易行，但不能准确地测定蛋白质水解液中的氨基数量。测定标准氨基酸时，其误差可达 10% 左右。脯氨酸与甲醛作用时，产生不安定的化合物，测定的结果略低。酪氨酸由于含有酚基，可能使结果过高。有关甲醛滴定的理论叙述，见参考书目^(27, 28)。方法方面一些问题，见参考书目⁽²⁹⁾。

器材 (1) 100 毫升锥形瓶；(2) 吸量管；(3) 滴定管。

试剂 (1) 约 0.1N 的甘氨酸溶液；(2) 0.1N 氢氧化钠标准溶液；(3) 0.5% 酚酞酒精溶液；(4) 中性甲醛溶液^[24]。

操作 取 3 个标有号码的 100 毫升锥形瓶。于第 1、2 号两瓶内各加甘氨酸溶液 2 毫升，水 5 毫升及酚酞指示剂 5 滴。于第 3 号瓶内加入 7 毫升蒸馏水及指示剂 5 滴作对照。摇匀后，由滴定管中滴加 0.1N 氢氧化钠溶液至桃红色^①。保留第 1 号锥形瓶作比色标准，于第 2、3 号中各加中性甲醛溶液 2 毫升，再用 0.1N 氢氧化钠溶液滴定至与标准液颜色相同为止。向第 1 号瓶内加中性甲醛 2 毫升，用 0.1N 氢氧化钠滴定至红色，颜色深度与第 2 号瓶相同为止^②。计算溶液中的氨基氮的毫克数。

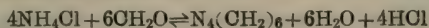
甲醛滴定补充实验

为了复习酸碱滴定知识和更好的体会甲醛滴定的意义，进行以下滴定实验。在进行实验前，复习定量分析化学与酸碱滴定和指示剂选择原理有关的讲演讲义和实验讲义。

实验 取 3 个 50 毫升锥形瓶并标号，从 25 毫升滴定管准确

① 滴定终点颜色的确定很重要，而说法不同。按我们的经验，滴定至桃红色为最适宜。

② 当溶液中含有大量的铵盐时，滴定结果偏高。因为铵与甲醛作用形成 6-次甲基 4 氮，应放出铵盐的酸，其反应如下：



地量入 5 毫升 0.1N HCl 并各加 5 毫升水。分别加入 2—3 滴 0.1% 溴甲酚綠 (BCG)、酚紅 (PR) 和酚酞 (PP) 的酒精溶液。用 0.1N NaOH 滴定到終点, 并記錄結果。

从另一 25 毫升滴定管量取 5cc 0.1N 醋酸 3 份。重复以上滴定实验, 并記錄結果。

参考酸碱滴定曲线图, 解釋你的实验結果。

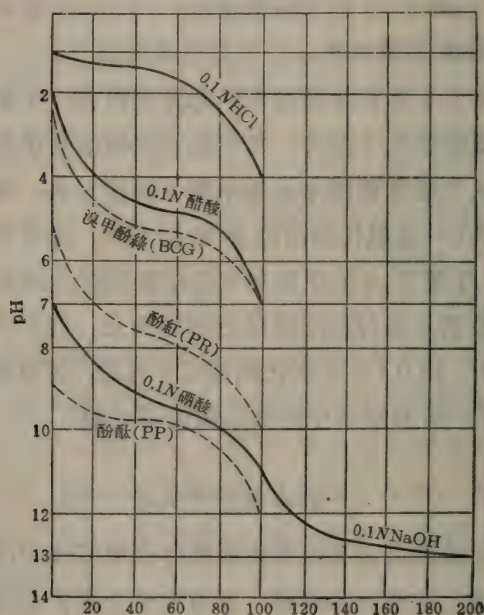


图 4. 酸碱滴定曲线。

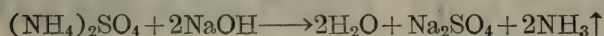
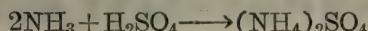
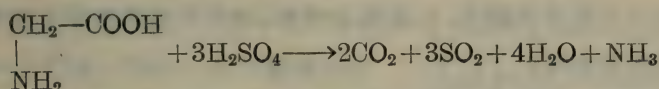
实验十六 总氮量的测定

微量凯氏 (micro-Kjeldahl) 定氮法

天然有机物 (如蛋白质和氨基酸等化合物) 的含氮总量通常用微量凯氏定氮法来测定。方法的原理简述如下。

用濃硫酸消化时, 天然的含氮有机化合物分解成氨, 氨与硫酸

化合生成硫酸铵。分解反应进行很慢,可借硫酸铜和硫酸钾(或硫酸钠)来促进。硫酸铜为催化剂,硫酸钾或硫酸钠可提高消化液的沸点^①。消化完了后,用强碱碱化消化液使硫酸铵分解,放出氨。借蒸汽蒸馏法,将氨蒸入过量标准无机酸溶液中,然后用标准碱溶液进行滴定。以甘氨酸为例,经过的化学反应如下。



收集氨的酸性溶液也可用硼酸溶液,氨与溶液中氢离子结合生成铵离子,使溶液中氢离子浓度减低。然后再用标准无机酸滴定,直至恢复溶液中原来氢离子浓度为止。所用无机酸的当量数量即相当于未知物中氨的当量数量。本法适用范围约为0.2—1.0毫克氮。有关凯氏定氮的一些文献,见参考书目⁽³⁰⁻³³⁾。

器材 (1)50毫升凯氏烧瓶4个;(2)50毫升锥形瓶5个;(3)5毫升微量滴定管;(4)5毫升吸量管;(5)1毫升和2毫升奥氏吸量管;(6)50毫升量瓶;(7)10毫升量筒;(8)表面皿;(9)凯氏消化架;(10)凯氏蒸馏装置。

试剂 (1)猪血清^[25];(2)无氨浓硫酸;(3)粉末硫酸钾-硫酸铜混合物($\text{K}_2\text{SO}_4:\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}=5:1$);(4)30%氢氧化钠;(5)2%硼酸;(6)混合指示剂^[26];(7)0.01N标准盐酸溶液;(8)标准硫酸铵溶液(0.3毫克氮/毫升)。

操作 (1)样品制备:取50毫升量瓶,用奥氏吸量管量加血清

① 促进剂的种类很多,可以用3:1,6:1或10:1的 $\text{K}_2\text{SO}_4\text{—CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 混合物。还有人使用由80份 K_2SO_4 ,20份 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 与0.3份 SeO_2 (或0.34份 Na_2SeO_4)充分研细混合的混合物。少量 HgCl_2 (约0.032克/克促进剂)可以加速赖氨酸和组氨酸的消化分解。

1 毫升。用蒸馏水稀释到刻度，混匀备用。溶液如显浑浊，加少量氯化钠，再混匀。

(2)消化: 准备 4 个 50 毫升凯氏烧瓶，并标号。向第 1、2 两烧瓶内，用奥氏吸量管，仔细地，各加入 2 毫升稀释血清溶液。注意，将溶液加到烧瓶底部，勿使溶液粘烧瓶口及瓶颈。于 3、4 两号烧瓶中各加入 2 毫升蒸馏水，作为空白对照(用以测定试剂中可能含有的微量含氮物质)。

在每个凯氏烧瓶中先加硫酸钾-硫酸铜混合物约 100 毫克，再用量筒加浓硫酸 1.5 毫升，(不能用吸量管!)。将以上 4 个凯氏烧瓶放在凯氏消化架(图 5)上(如无消化架在通风橱内消化)。用小火焰加热煮沸。待瓶内水汽蒸完，硫酸开始分解放出 SO_2 白烟后，调节火焰保持瓶内液体轻微沸腾，继续消化，直至消化液几无颜色为止(黄色表示消化尚未完全)。全部消化过程约需 1—2 小时^①。消化完了后，关闭火焰。取下烧瓶放在通风橱内冷却至室温。

(3)蒸馏: 取 50 毫升锥形瓶 5 个，用蒸汽洗涤(图 5)2—3 分钟(图 6)。冷后，用吸量管各加入 2% 硼酸溶液约 5 毫升及混合指示剂 4 滴(约 0.05 毫升)。溶液应呈棕紫色。用表面皿复盖备用。

先煮沸蒸汽发生器(图 7)。器中盛有用几滴硫酸酸化过的蒸馏水，关闭夹子，使蒸汽通过反应室，由冷凝器下端逸去。在冷凝器下端放一空烧杯以承接凝聚的水滴。这样用蒸汽洗涤蒸馏器约 10 分钟后，在冷凝器下端放一盛有硼酸溶液的锥形瓶，位置倾斜如图。冷凝器顶端应完全浸没在液体内。继续蒸汽洗涤 1—2 分钟。观察锥形瓶内溶液是否变色。如不变色，则证明蒸馏器内部干净。向下移动锥形瓶使硼酸液面离开冷凝管口约 1 厘米，继续通蒸汽

^① 含有较多赖氨酸或组氨酸的样品，需要消化时间较长。应该注意，消化液变清亮并不一定说明消化完全。

1 分钟。最后,用水冲洗冷凝器管外口,减小火焰。打开夹子①,准备下一步把消化液移入蒸馏器内②。

为了把凯氏消化瓶内的溶液移到蒸馏器反应室内时,不使溶液粘联在消化瓶口上,可先在瓶“下口唇”薄薄涂敷一层凡士林,再把烧瓶中之溶液沿“下口唇”细心地由小玻杯注入反应室。用蒸馏水将凯氏烧瓶冲洗 3 次(每次用 2 毫升),把洗液倾入反应室。塞紧棒状玻塞。取另一含有硼酸溶液的锥形瓶,放在冷凝器下,使冷凝器顶端完全浸没在液体内。位置倾斜如图。

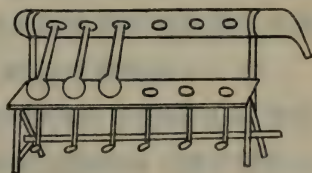


图 5. 凯氏消化架。



图 6. 用水蒸汽洗涤锥形瓶。

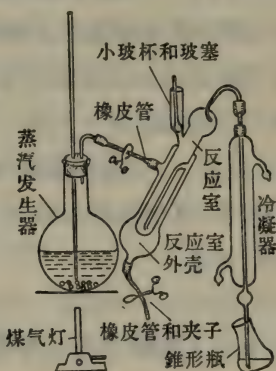


图 7. 凯氏蒸馏装置。

取 30% 氢氧化钠溶液约 10 毫升放入小玻杯,轻提棒状玻塞,使之慢慢流入反应室。当未完全流入时,将玻塞盖紧,向玻杯中加

① 掌握夹子和玻塞很重要。若玻塞不紧,也不用水封闭,则有氨逸出的危险。在加样时一定要打开夹子,而且一定要在蒸汽发生后才能关闭,否则就会发生样品倒吸现象。

② 在蒸馏样品和空白对照以前,为了练习蒸馏和滴定操作,可用标准硫酸铵溶液试作实验 2—3 次。每毫升标准硫酸铵溶液含 0.3 毫克氮,每次用 2 毫升试蒸。

蒸餾水約 3 毫升。再輕提棒塞，使一半蒸餾水流入反應室，一半留在玻杯中作水封。用煤氣燈加熱水蒸汽發生器，沸騰後，夾緊夾子開始蒸餾。錐形瓶中硼酸溶液由棕紫色變成藍綠色，自變色起記時，蒸餾 3—5 分鐘。移動錐形瓶使硼酸液面離開冷凝管約 1 厘米，并用少量蒸餾水洗滌冷凝管口外面，繼續蒸餾一分鐘，挪開錐形瓶，用表面復蓋錐形瓶。最後鬆開夾子，移去煤氣燈，待其餘 3 個凱氏燒瓶中溶液蒸餾完了後，一同滴定。

在一個蒸餾完畢後，為了洗滌反應室，擰緊夾子，一手捏緊橡皮管，一手輕提棒狀玻塞，使冷水迅速流入反應室。因反應室外殼內蒸汽冷縮，結果反應室中的殘液自動吸入反應室外殼，塞住玻塞，取蒸餾水約 20 毫升加入小玻杯，啟開玻塞，冷水再次由小玻杯流入反應室，又自動吸出。如此沖洗 3—4 次，把夾子打開，排除反應室外殼中積水。關閉夾子，再使蒸汽通過全套蒸餾儀數分鐘後，繼續下一個蒸餾。

(4) 滴定：全部蒸餾完畢後，以 0.01N 鹽酸滴定各錐形瓶中收集的氨量，直至硼酸溶液出顯淡紫色為止（即滴定終點）^①。計算血清的總氮量。

實驗十七 雙縮脲比色法測定蛋白質

雙縮脲顏色反應可用來定量測定蛋白質。在一定實驗條件下，把被檢溶液與雙縮脲試劑反應後生成的顏色與標準蛋白質溶液作比較。標準蛋白質溶液可用血清清蛋白，雞子清蛋白或酪蛋白等配制。在這裡，我們假定，未知蛋白質的量相等時，雙縮脲反應生成的顏色深淺度相等。

器材 (1) 試管；(2) 1 毫升、5 毫升吸量管各 1 個；(3) 光电比

① 蒸餾和滴定时，空气中不能有酸性或碱性蒸汽。

色計。

試剂 (1)双缩脲試剂^[27]; (2)蛋白质溶液 (1—10 毫克蛋白质/毫升); (3)标准酪蛋白溶液, 每毫升含酪蛋白 10 毫克。

操作 向 1.0 毫升含有 1—10 毫克蛋白质的溶液中, 加入 4.0 毫升双缩脲試剂。混匀。在室温 20—25°C 下, 静置 30 分钟。在光电比色計或分光光度計上 540—560 毫微米区域测定消光系数 (或透光度)。取 1.0 毫升水或合适的盐溶液作空白試驗。用光电比色計测定未知溶液消光系数时, 以它来校正零点。

为了繪制标准曲綫, 另取 5 个試管并标号。分别量入 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 毫升标准酪蛋白溶液, 加水稀釋至 1 毫升。按照上法用 4 毫升双缩脲試剂显色后, 测定消光系数。

将所得消光系数与酪蛋白溶液的濃度繪制标准曲綫。未知样品中蛋白质的含量可根据其消光系数在标准曲綫上求得。

有大量脂肪性物质同时存在时, 将产生混浊的反应混合物。这可用乙醇或石油醚澄清, 离心后再测定讀数。

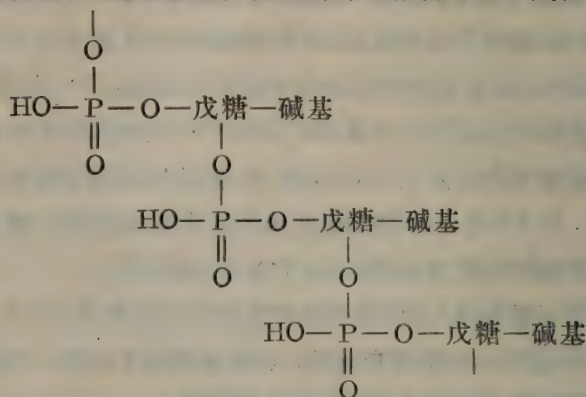
核蛋白的化学

核蛋白是一类重要的結合蛋白质。它是一切生物体必不可少的組成成分。它与生长、发育、遺傳、繁殖等生命現象有密切关系。因为核蛋白在蛋白质的合成中具有特别重要的意义, 迅速生长的器官和組織 (胚胎組織和肿瘤) 以及进行旺盛合成作用的器官 (造血器官、胰臟和其他腺体組織) 都含有极丰富的核蛋白。一些最簡單的生命形态如病毒, 就是核蛋白。

核蛋白由高分子的核酸和簡單蛋白质 (往往是精蛋白和組蛋白) 組成。按照組成成分的不同, 核酸可分为脫氧核糖核酸和核糖核酸, 前者集中在細胞核中, 后者則分布在細胞质和核仁中。

核酸分子是由許多单核苷酸以 3'—5' 磷酸二酯鍵連接起来的

多核苷酸鏈。每个单核苷酸又由碱基(嘌呤和嘧啶)、戊糖(核糖或脱氧核糖)和磷酸組成。核酸的部分結構可用下式表示。



实验十八 肝臟核蛋白的分离提取 和核酸成分的鉴定

pH 和 NaCl 濃度对于核蛋白的溶解度有很大影响。RNA 蛋白在微酸或微碱的 0.14M NaCl 溶液中的溶解度較高,在其等电点 (pH4.5) 时,其溶解度則显著地降低。DNA 蛋白在 0.14 M NaCl 的溶解度仅为其水中溶解度的 1%,但在 1 M NaCl 溶液中,其溶解度可达水中溶解度的两倍。利用 RNA 蛋白和 DNA 蛋白的溶解度上的差异,我們可以分別提取这两类核蛋白。为了尽量避免核蛋白的变性和降解,应在低溫下 进行分离提取。并于 NaCl 溶液中加入 0.01M 檸檬酸鈉以抑制脱氧核糖核酸酶的作用。有关核蛋白和核酸的分离提取可參閱参考书目^(34,35)。

稀酸可以催化核蛋白水解成核酸和蛋白质,还可以催化核酸和蛋白质水解生成它們的組成成分。

器材 (1)离心管;(2)試管及試管架;(3)水浴鍋;(4)研鉢或玻璃手勻漿器;(5)漏斗;(6)离心机;(7)台秤。

試劑 (1)0.14 M NaCl 溶液(含有 0.01 M 檸檬酸鈉); (2) 1.0 M NaCl 溶液; (3) 1 N 鹽酸; (4) 0.4% NaOH; (5) 双縮脲試劑^[27]; (6) 10% 硫酸; (7) 濃氨水; (8) 0.1 N 硝酸銀溶液; (9) 10% 硝酸; (10) 3 N 鉬酸銨; (11) Bial 氏試劑^[4]; (12) 二苯胺試劑^[28]; (13) 10% 醋酸; (14) 10% 硫酸鈉; (15) 飽和亞硫酸氫鈉溶液。

操作 稱取動物(大鼠或家兔)新鮮肝組織約 2 克, 放入冰浴中的小研鉢中研磨成漿。加入 3 毫升冰冷的含有 0.01 M 檸檬酸鈉的 0.14 M NaCl^①, 繼續研磨 3—5 分鐘^②。將勻漿傾入 15 毫升離心管中, 并用 5 毫升含 0.01 M 檸檬酸鈉的 0.14 M NaCl 沖洗研鉢。洗液一并倒入離心管中。用玻棒緩慢攪拌 3—5 分鐘後, 離心(2000—3000 轉/分) 5—10 分鐘。保留勻漿殘渣作 DNA 蛋白提取實驗。將上清液倒入另一離心管中, 滴加 1 N 鹽酸調上清液 pH 到 4.5。放入冰浴中使 RNA 蛋白慢慢沉淀出來。放在冰水浴中 15—30 分鐘後, 離心, 棄去上清液。保留 RNA 蛋白沉淀作水解實驗(為了制純, 可再一次溶于 0.14 M NaCl、調 pH 沉淀)。在此 15—30 分鐘時間內, 進行以下 DNA 蛋白提取實驗。

向保留的勻漿殘渣加 2 毫升 1 M NaCl。用玻棒攪勻後, 移入小乳鉢中。用力研磨 5—10 分鐘(可加些細玻璃砂)。再加 5 毫升 1 M NaCl 繼續用力研磨 3—5 分鐘^②。轉入離心管。混勻後, 離心(2000—3000 轉/分) 10 分鐘。棄去殘渣, 將上清液傾入小燒杯中, 沿杯壁慢慢加入 6 倍體積的冰水。用細玻璃棒慢慢攪拌溶液, 即有纖維狀 DNA 蛋白沉淀析出。傾棄大部分上清液, 然後離心得

① 提取核蛋白用的 NaCl 溶液和沖稀用的蒸餾水都應該是冰冷的, 否則, 得不到高分子纖維狀的 DNA 蛋白。

② 第一次研磨只為了打破細胞膜以便提取出核糖核蛋白, 不要磨得過細。第二次研磨殘渣是為了分離脫氧核糖核蛋白, 要打破核膜, 因此須用力仔細研磨。否則, 不能提出。

DNA 蛋白质沉淀^①。

使用以上制得的 RNA 蛋白和 DNA 蛋白分别作以下实验。

用 2 毫升 0.4% NaOH 溶液溶解 RNA 蛋白沉淀。取 0.5 毫升作双缩脲反应。向其余 1.5 毫升加入 6 毫升 10% H_2SO_4 ，并在沸水浴中加热水解 15—30 分钟。过滤。取滤液进行以下实验。

取 1 毫升滤液，加氨水使成碱性反应。再加入 0.1N $AgNO_3$ 溶液约 1 毫升。放置片刻，观察有无白色嘌呤碱基的银化合物沉出。

碱基测定亦可按下法进行。取滤液 2 毫升，用 10% 醋酸酸化溶液后煮沸并过滤。在滤液中加入 1 毫升 10% $CuSO_4$ 和 0.5 毫升饱和亚硫酸氢钠溶液。再加热。如有嘌呤碱基存在，则溶液呈黄绿色，即腺嘌呤和鸟嘌呤的铜化合物的颜色。放置后，溶液变混浊。

另取滤液 2 毫升，先加入氨水使成微碱性反应，再加入 10% HNO_3 使成酸性反应。加入 1 毫升 3N 钼酸铵溶液后，在沸水浴中加热。观察有无黄色磷钼酸铵沉淀。

另取 1 毫升滤液 2 份，分别加入等体积的地衣酚试剂和二苯胺试剂。在沸水浴中加热 10—15 分钟。比较并解释颜色变化。

向 DNA 蛋白沉淀中加入 1 毫升 1M NaCl 溶液，令其溶解。加入 1 毫升二苯胺试剂后，在沸水浴中加热 10—15 分钟。观察颜色变化^②。

实验十九 脾脏脱氧核糖核蛋白的提取和鉴定

器材 (1)小乳针；(2)玻璃粉；(3)离心机；(4)试管；(5)100毫

① 加入蒸馏水时要沿壁慢加。如猛然倒入，会把 DNA 蛋白纤维冲散。纤维状 DNA 蛋白可以用玻棒逐渐团绕起来，不必离心。

② 因为 DNA 蛋白较少，所以不用作水解。若量较多，也可与 RNA 蛋白一样水解。

升燒杯；(6)量筒；(7)水浴鍋。

試劑 (1)5% NaCl 溶液；(2)0.4% NaOH 溶液；(3)1% 二苯胺試劑^[28]。

操作 將動物(大鼠或家兔)殺死，迅速取出脾臟并用冰冷卻。稱取約 0.5 克脾組織，置于用碎冰圍繞的小乳鉢中。加 0.5 克玻璃粉或河砂，共同研磨。逐漸分次加入 15 毫升冰冷的 5% NaCl 溶液，隨加隨磨。加完后，繼續研磨 10—15 分鐘。傾入離心管內，離心 15 分鐘(4000 轉/分)。將離心液傾入盛有 80—90 毫升冰冷蒸餾水的燒杯內。脫氧核糖核蛋白呈纖維狀沉淀析出。以玻璃棒攪拌懸浮液，使核蛋白纏繞在棒上。以上操作均在 0°C 左右進行。將纖維狀核蛋白小心取出，溶于 1—2 毫升 0.4% NaOH 溶液中。取 1 毫升溶液，加等體積二苯胺試劑，在沸水浴上加熱 10 分鐘。觀察出現的藍色。

實驗二十 酵母核糖核蛋白的水解 及核糖核酸成分的鑑定

酵母細胞中含有豐富的核糖核蛋白。

(A)用 5% 硫酸煮沸時，可部分地水解酵母的核蛋白，生成磷酸、戊糖、鹼基和簡單蛋白質。簡單蛋白質也發生部分水解。

器材 (1)250 毫升燒瓶；(2)40 厘米長的迴流冷凝器(或以長玻璃管代替)；(3)漏斗；(4)試管及試管架。

試劑 (1)干酵母；(2)5% 硫酸；(3)10% 氫氧化鈉溶液；(4)Benedict 氏試劑^[6]；(5)1% 硫酸銅溶液；(6)15% 氨水；(7)濃氨水；(8)鉬酸銨溶液^[29]；(9)10% 硝酸；(10)0.1N 硝酸銀溶液；(11)Tollen 氏試劑^[8]；(12)濃硝酸；(13)10% 三氯醋酸。

操作 把約 5 克酵母稱入 250 毫升燒瓶內，添加 5% 硫酸 30—40 毫升。裝上迴流冷凝器，煮沸內容物 1 小時。冷後，每 10 毫

升水解液加入 4 毫升 10% 三氯醋酸, 以沉淀蛋白质。过滤。用 10% NaOH 中和。用滤液分别进行下列试验。

(1) 还原糖试验: 取滤液 1 毫升, 以 10% 氢氧化钠进行中和, 加 1 毫升 Benedict 氏试剂。摇匀后, 加热。观察结果。另用 Tollen 氏试剂证明此还原糖为戊糖。

(2) 磷酸试验: 取滤液 2 毫升, 先加 15% 氨水致弱碱性反应, 再加 10% 硝酸到酸性反应。最后加钼酸铵溶液约 1 毫升。加热。注意有无黄色磷酸铵沉淀。

(3) 嘌呤碱基试验: 取滤液 2 毫升, 加浓氨水至碱性反应。过滤。向滤液中加入 0.1N 硝酸银溶液约 1 毫升。放置片刻, 观察有无白色嘌呤碱基的银化合物沉淀。

(B) 酵母细胞中的核糖核酸蛋白也可用 0.4% NaOH 溶液提取, 并在 pH4—5 时沉淀析出。

器材 (1) 研钵; (2) 烧瓶; (3) 锥形瓶; (4) 试管和试管架。

试剂 (1) 干酵母; (2) 乙醚; (3) 0.4% NaOH 溶液; (4) 10% HCl; (5) 5% H_2SO_4 ; (6) Benedict 氏试剂^[6]; (7) Tollen 氏试剂^[3]; (8) 浓氨水; (9) 浓 HNO_3 ; (10) 3N 钼酸铵; (11) 5% $AgNO_3$ 。

操作 取 20 克干酵母, 加 5 克细砂、5 毫升乙醚、5 毫升水。在研钵中充分研磨。在研磨时不断加入少量水, 使最终成为浆状液。将此浆状液转移到带塞的玻璃锥形瓶中, 并用 0.4% NaOH 冲洗研钵。再加 0.4% NaOH 到 100 毫升左右。加入 3 毫升甲苯, 盖上盖子, 放置 24 小时或更长, 并时常振动。过滤。弃去残渣, 在滤液中滴加 10% HCl, 调 pH 在 4—5 之间, 放置, 使核蛋白沉淀。倒去上清液。将沉淀转入烧瓶中, 加 50 毫升 5% H_2SO_4 , 在水浴中加热 1 小时, 并不断加水保持原体积。过滤。用滤液按照上边的方法进行: (1) 还原糖和戊糖试验; (2) 磷酸试验; (3) 嘌呤碱基试验。

實驗二十一 用定磷法測定組織中的 RNA 和 DNA

核酸是一类复杂的化合物,在稀碱或酶的作用下,分解成为单核苷酸。单核苷酸可进一步水解成磷酸、戊糖(D-核糖或D-2-脱氧核糖)和嘌呤或嘧啶类化合物。根据其糖的成分,可将核酸分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。

根据 Schmidt 和 Thannhauser 法⁽³⁶⁾,由組織中,将能溶于酸的无机磷和磷脂除去后,剩余的含磷化合物为核酸和磷蛋白。在室温下,以1*N*氢氧化鈉或氢氧化鉀水解16小时,DNA 保持其不溶于酸的性质,RNA 分解成可溶于酸的单核苷酸,而磷蛋白的磷則完全变成无机磷。分別測定这三种形式的磷即可算出組織中 DNA 和 RNA 的含量。

器材 (1)50 或 100 毫升量筒 1 个;(2)10 毫升吸量管 1 个;(3)5 毫升吸量管 2 个;(4)1 毫升吸量管 2 个;(5)小研鉢 1 个;(6)离心管 2 个;(7)离心机(4000 轉/分);(8)干燥器。

試剂 (1)7%三氯醋酸;(2)1%三氯醋酸;(3)酒精;(4)乙醚;(5)甲醇;(6)氯仿;(7)1*N*NaOH 或 KOH;(8)6*N*HCl。

操作 准确称取肝組織或其他組織約 2 克,放在在碎冰上的乳鉢內,与 20 份(体积)冰冷的 7%三氯醋酸溶液磨成匀浆(約 10 分钟)。离心,傾出上层清液。用冷的 1%三氯醋酸洗滌沉淀物 2—3 次,直到洗滌液中不含无机磷为止(用 α -1, 2, 4 氨基萘酚 磺酸 檢查)。此后用酒精和乙醚連續洗滌各二次,将沉淀悬浮在 30—40 倍(組織湿重)酒精-乙醚混合液(3:1*V/V*)中,在水浴上迴流 10 分钟。离心,并用乙醚洗滌沉淀。将干的沉淀再与 30—40 倍体积甲醇和氯仿混和液在水浴上煮沸迴流 30 分钟。将沉淀物离心,用乙醚洗滌。最后,在盛有石蜡碎片的干燥器中干燥,直到除去乙醚。

将干燥的粉末置于 10 毫升 1*N* 氢氧化钠溶液中, 在室温下不断振荡 16 小时。碱水解毕, 离心除去不溶性物质。取出一定量上层清液(1—2 毫升), 测定其中 RNA、DNA 和磷蛋白的总磷量(P_1)。另取出 5 毫升清液, 加入 1 毫升 6*N* NaCl 和 5 毫升冰冷的 7% 三氯醋酸。在此情况下, 脱氧核糖核酸被沉淀, 而核糖核酸水解生成的单核苷酸和磷蛋白水解生成的无机磷定量地留于清液中。取出一定量的(1—2 毫升)上层清液, 测定 RNA 和磷蛋白的总磷量(P_2)和来自磷蛋白的无机磷含量(P_3)。磷蛋白的磷一般很少, 甚至没有。

计算 核酸总磷量 = $P_1 - P_3$;

核糖核酸含磷量 = $P_2 - P_3$;

脱氧核糖核酸含磷量 = $(P_1 - P_3) - (P_2 - P_3) = (P_1 - P_2)$ 。

核糖核酸含磷量为 9.5%, 脱氧核糖核酸含磷量为 9.84%。将所得核糖核酸和脱氧核糖核酸磷量分别乘以系数 10.5 和 10.1, 即得核糖核酸和脱氧核糖核酸的含量。

各种含磷化合物的测定方法

测定各种含磷有机化合物的方法经常是先把这些有机化合物水解放出无机磷, 然后测定无机磷。不同含磷有机化合物的水解条件不同。

最通用的测定磷酸的方法是各种比色法。磷酸和钼酸铵反应生成磷钼酸。磷钼酸被还原时, 产生钼蓝。测定钼蓝颜色的强度来计算磷酸含量的方法, 为这些方法的一种。Fiske-Subbarow⁽³⁷⁾用 α -1, 2, 4 氨基苯酚磺酸作为还原剂。

1. 无机磷的测定法

无机磷的测定, 可以直接在溶液内进行, 或者用镁盐沉淀出来以后进行。

无机磷很少时(如无蛋白滤液),不易沉淀,可以直接取原有溶液,进行測定。

器材 (1)試管; (2) 1 毫升吸量管 2 个; (3) 2 毫升吸量管 2 个; (4) 5 毫升吸量管 2 个; (5) 恒溫水浴鍋。

試剂 (1) 5 *N* 硫酸溶液; (2) 2.5% 鉬酸鉍溶液; (3) α -1, 2, 4 氨基萘酚磺酸溶液^[30]; (4) 标准磷酸盐 (KH_2PO_4) 溶液(每毫升含磷 0.05 毫克加入 1—2 滴氯仿防腐)。

操作 取 3 支試管, 分別标号。在第 1 支試管内, 加入无蛋白滤液 1 毫升, 第 2 支試管内, 加入标准磷酸盐溶液 1 毫升, 第 3 支試管内, 加蒸餾水 1 毫升作为空白对照。然后各加 2.5 毫升鉬酸鉍-硫酸混合液(由等体积 2.5% 鉬酸鉍溶液及 5 *N* 硫酸配成)及 1:4 稀釋的 α -1, 2, 4 氨基萘酚磺酸溶液 0.5 毫升。用水稀釋到 10 毫升。混勻并放在 37°C 恒溫箱內保溫 10 分钟。冷后, 进行比色。

2. 总磷量的測定法

先用濃硫酸消化无蛋白滤液, 将有机磷变为无机磷后, 再行測定。

器材 (1) 测无机磷所用之器材; (2) 100 毫升凱氏燒瓶 3 个; (3) 10% NaOH 溶液; (4) 30% 过氧化氢; (5) 酚酞——溶于 60% 酒精的 0.5% 溶液。

有机磷的无机化: 取 1 毫升无蛋白滤液, 放入小凱氏燒瓶內。加入 2 毫升 5 *N* 硫酸后在电炉上加热。当所有水分被蒸发后, 將燒瓶略为冷却, 然后加 1—2 滴 30% 过氧化氢溶液。过氧化氢須直接加入溶液中, 不可滴在燒瓶的壁上。重新加热 10 分钟。如果溶液仍为棕色, 可再加 1—2 滴过氧化氢溶液, 繼續加热。如果加过氧化氢 10 分钟后, 溶液已透明无色, 证明消化已完全。冷却后, 加 2—3 毫升水, 再煮約 10 分钟, 使焦磷酸水解。將溶液傾入 10 毫升(或

25毫升)容量瓶内(或刻度试管)。用蒸馏水冲洗烧瓶,并将洗液一并加入量瓶内。混合后,用酚酞作指示剂加碱中和,最后,加水至刻度。

磷的比色测定:取出1—2毫升溶液,加2.5毫升钼酸铵混合液及0.5毫升 α -1,2,4氨基萘酚磺酸溶液。用水稀释至10毫升。在37°C下保温10分钟,然后比色。每次都用标准磷样品作为比色的标准,并作空白对照。

参考书目

- (1) Schiff, H., Ber., **29**, 298 (1896).
- (2) Masaji Tomita, H. S., Z. physiol. Chem., **201**, 38 (1931).
- (3) Millon, E., Compt. Rend., **28**, 40 (1849).
- (4) Arnow, L. E., J. Biol. Chem., **118**, 531 (1937).
- (5) Salkowski, E., Z. physiol. Chem., **12**, 215 (1888).
- (6) Koch, F. C and Hanke, M. E., Practical Methods in Biochemistry, 6th Ed., p. 49 (1953).
- (7) Johnson, T. B. and Kohman, E. F., J. Am. Chem. Soc., **37**, 1863, 2170, 2598 (1915); **38**, 1392 (1916).
- (8) Adamkiewicz, A., Arch. Geo. Physiol., **9**, 156 (1874).
- (9) Hopkins, F. G. and Cole, S. W., J. Physiol., **27**, 418 (1902).
- (10) Acree, S. F., J. Biol. Chem., **2**, 145 (1906).
- (11) Rosenheim, O., Biochem. J., **1**, 233 (1906).
- (12) 霍克等著, 实用生物化学, 中山医学院生化教研室译, 94页 (1961).
- (13) Winkler, S., Z. physiol. Chem., **228**, 50 (1934).
- (14) Harvey, D. G., Miller, E. T. and Robson, W., J. Chem. Soc., 153 (1941).
- (15) Kappeller-Adler, R., Biochem. Z., **264**, 131 (1933).
- (16) Sakaguchi, S., J. Biochem. (Japan), **4**, 24 (1925).
- (17) Rapoport, S. M. und Raderecht, H. J., Physiologisch-Chemisches Praktikum, p. 133, Veß verlag Technik, (1956).

- (18) Robert, B. J., *Laboratory Manual for Biochemistry*, p. 43 (1958).
- (19) Dubnoff, J. W., *J. Biol. Chem.*, **141**, 710(1941).
Kossell, B. et al., *J. Biol. Chem.*, **145**, 359(1942).
- (20) 如(17) p. 128.
- (21) Ruhemann, S., *J. Chem. Soc.*, **97**, 2025(1910).
- (22) Ruhemann, S., *J. Chem. Soc.*, **99**, 1486(1911).
- (23) Yemm, E. W. and Cocking, E. C., *The Analyst*, **80**, 209(1955).
- (24) Slyke, D. D. van, et al., *J. Biol. Chem.*, **141**, 627(1941).
- (25) Grassmann, W. and van Arnin, K., *Annalen*, **509**, 288(1934);
519, 92(1935).
- (26) Sørensen, S. P. L., *Biochem. Z.*, **7**, 45(1907).
- (27) Clark, W. M., *Topics in Physical Chemistry*, p. 309(1952).
- (28) French, D. and Edsall, J. T., *Advances in Protein Chemistry*,
Vol. **II**, p. 278(1945).
- (29) Smith E. L. and Davis, N. C., *Methods of Biochemical Analysis*,
Vol. **II**, p. 215(1954).
- (30) Kjeldahl, J., *Z. Anal. Chem.*, **22**, 366(1883).
- (31) 有关凯氏定氮法的综合性文章:
1) Bradstreet, R. B., "A Review of the Kjeldahl Determination of Organic Nitrogen", *Chem. Rev.*, **27**, 331(1940).
2) Ma, J. S. and Znazaga, G., "Micro-Kjeldahl Determination of Nitrogen", *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **14**, 280(1940).
3) Kirk, P. L., "Kjeldahl Methods for Total Nitrogen", *Anal. Chem.*, **22**, 254(1950).
- (32) 关于凯氏定氮法的一些发展:
1) Kirk, P. L., *Advances in Protein Chemistry*, Vol. **III**, p. 149 (1947).
2) Kirsten, W., *Anal. Chem.*, **25**, 74(1953).
- (33) 关于凯氏定氮法的具体操作:
1) Pregl, F., *Quantitative Organic Microanalysis*, 4th Ed., p. 88 (1945).

- 2) 潘家秀等編, 蛋白质化学研究技术, 4—8頁(1962).
- 3) Nieuwenburg, C. J. van and Ligten, J. W. L. van, Quantitative Chemical Micro-Analysis, p. 158(1963).
- (34) Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Methods in Enzymology, Vol. II, Section V (1957).
- (35) Chargaff, E. and Davidson, T. N., The Nucleic Acid, Vol. I(1955); 中譯本: 核酸, 第一卷, 354—457頁(1963).
- (36) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J., J. Biol. Chem., **161**, 83 (1945).
- (37) Fiske, C. H. and Subbarow, Y., J. Biol. Chem., **81**, 629(1929)。

第四章 維生素、激素及植物次生物質

(一)維生素是一類具有不同化學結構的有機化合物，為促進動物生長及維持健康所必需；需要量雖然不大，但動物體不能自行合成。在動物機體內，維生素、酶和激素，在高級神經活動影響下，共同控制和調節代謝作用。當機體缺乏某種維生素時，就會發生維生素不足症或缺乏症。

維生素分為兩大類：(1)脂溶性維生素，包括維生素A和維生素D等；(2)水溶性維生素，包括維生素B族和維生素C等。

定性鑑定和定量測定維生素的方法有物理方法（如利用吸收光譜）、化學方法（利用各種維生素的特殊化學反應）及生物學方法（利用動物及微生物作實驗材料）。

(二)激素是由人體或動物體內某些組織或器官（內分泌腺）所製造、不經導管而直接進入血液淋巴系統的生物學活性物質。激素的分泌受中樞神經系統直接或間接控制。隨血流入機體各部後，它們刺激或抑制整體或某些器官的生理生化活動。

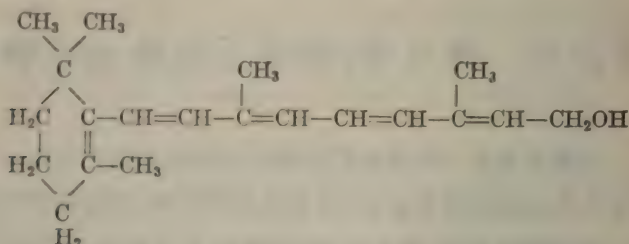
根據化學結構，已知的激素可分為(1)含氮激素，像胰島素和催乳素等；(2)固醇激素，像腎上腺皮質激素和性激素等。

(三)植物次生物質的定義不甚明確，通常是指植物機體內除蛋白質、糖、脂類及維生素等以外的各種有機化合物。植物鹼、糖苷、植物激素、抗生素、脂肪族有機酸、鞣質、香精油和橡膠等均屬之。

實驗二十二 維生素A的定性試驗

維生素A（抗干眼病維生素）屬於脂溶性維生素。維生素A₁

結構式如下：



在氯仿溶液中，維生素A與三氯化銻生成不穩定的藍色，稱為Carr-Price反應⁽¹⁾。此呈色反應常用作維生素A的定性鑑定，並已發展成維生素A的定量測定法^(2,3)。

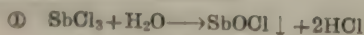
在本試驗中所使用的器材和試劑必須絕對干燥，微量水分即可使三氯化銻形成氯氧化銻（ SbOCl ），不再與維生素A起反應，並引起混濁^①。為了吸收可能混入反應液中的微量水分，可向試管中添加醋酸酐1—2滴。

類胡蘿卜素，包括胡蘿卜素和胡蘿卜素的氧化產物，也呈此顏色反應^②。此外，某些脂肪含有妨礙維生素A和三氯化銻反應的物質。在此情況下，應事先除去妨礙反應的物質^③，再進行試驗。有關維生素A的測定法，詳見參考書目⁽⁴⁾。

器材 (1)試管及試管架；(2)2毫升吸量管。

試劑 (1)魚肝油；(2)精餾氯仿^[31]；(3)溶于氯仿的三氯化銻飽和溶液^[32]；(4)醋酸酐。

操作 取1—2滴魚肝油，放入干燥潔淨的試管中，加氯仿約



② 可以根據生成產物吸收光譜的不同而區分它們。維生素A₁反應產物的最大吸收光譜在617毫微米，維生素A₂在693毫微米，而β-胡蘿卜素則在590和1020毫微米兩處有最大吸收光譜。

③ 可以用皂化法除去脂肪類物質，用層析法除去非維生素A和類胡蘿卜素等物質。

0.5 毫升和醋酸酐 1—2 滴。搖勻后，用滴管添加三氯化銻的氯仿溶液 1—2 毫升，再搖勻。注意观察藍色的生成和經過土紅色，最后变为褐紫色的变化^①。

实验二十三 維生素 D 的苯胺試驗

維生素 D (抗佝僂病維生素) 为固醇类化合物，易溶于脂肪及脂肪溶剂，不溶于水，对热比較稳定。至今已知維生素 D 有 5 种，多存于奶油、卵黄等食物中，魚肝油中含量更多。

維生素 D 与 SbCl_3 反应呈現深黃色^(5,6)，并在 500 毫微米处有最大吸收光譜。灵敏度达 0.2 γ 維生素 D₂。維生素 D 与 2-氯乙醇和乙酰氯氯仿溶液反应 (Sobel 等⁽⁷⁾) 形成比 SbCl_3 反应更稳定和特异綠色，在 625 毫微米有吸收光譜。維生素 D 还能与苯胺盐酸反应形成深紅色产物。測定維生素 D 的化学的和物理学的方法还不能完全代替生物学方法，因为最丰富的材料中維生素 D 的含量也很少，而一些干扰物质的含量却比較高。在使用鼠和鸡作实验动物的生物学方法中，几百万分之一的維生素 D 就能产生明显效应。Sobel 等⁽⁸⁾ 評述过測定維生素 D 的各种方法。

器材 試管及試管架。

試剂 (1) 魚肝油；(2) 苯胺-濃盐酸混合液 (15:1)。

操作 向試管内加入魚肝油約 1 毫升，苯胺-濃盐酸混合液約 3 毫升。充分搖勻，煮沸半分钟。黃色乳浊液便先轉变成綠色 (有时不明显)，再轉变成紅色。不久，乳浊液分成两层，下层为深紅色。

实验二十四 維生素 B₁ 的顏色反应

維生素 B₁ (抗神經炎維生素) 属于水溶性維生素。因含有硫

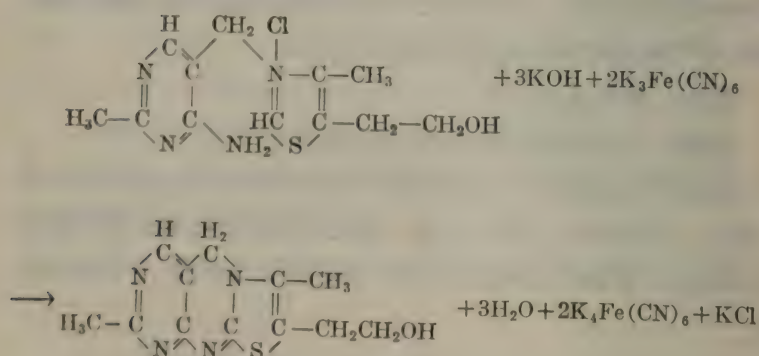
① 顏色变化較迅速，应及时观察。

及氨基，又名硫胺素。它在植物性食物中分布極廣，谷類種子表層中含量更為豐富。麥胚、米糠和酵母均為維生素 B_1 的良好來源。維生素 B_1 的化學測定法主要有下列兩種。

(一)重氮苯磺酸反應：此反應最先為 Pauly 在 1904 年提出⁽⁹⁾。經過一系列的爭論，最後為 Kinnersley 和 Peters 所確定⁽¹⁰⁾，並得到發展⁽¹¹⁻¹³⁾。在有碳酸氫鈉存在情況下，硫胺素能與重氮苯磺酸作用產生紅色。加入少量甲醛可使紅色穩定⁽¹³⁾。本反應不很靈敏，特异性也低。因為操作簡單迅速，往往用來檢查尿中的維生素 B_1 ⁽¹⁴⁾。

(二)螢光反應：硫胺素經輕微氧化作用後，即生成黃色而帶有藍色螢光的胱氨硫胺素（硫色素、硫胺螢）^①。溶于異丁醇中的胱氨硫胺素顯示的深藍色螢光，在紫外光下更為顯著。此反應很靈敏並有高度特异性^②，可用以定性或定量測定硫胺素⁽¹⁵⁾。

在鹼性環境中， $K_3Fe(CN)_6$ 可定量地將維生素 B_1 氧化成硫色素。



① 與蛋白質結合的硫胺素也能形成硫色素，但不能用異丁醇提取。因此，要測定結合形式的硫胺素時，必須先用磷酸酶或硫酸水解，使其從蛋白質中釋放出來。

② 螢光法靈敏度極高，可測出 0.01 γ 維生素 B_1 。

还有其他一些反应可以用来測定維生素 B₁。Schultz 等利用游离硫胺素能促进酵母发酵这一性质作硫胺素的微量測定。在生物体中硫胺素大部分以輔羧化酶（焦磷酸硫胺素）形式存在。因此，測定此輔酶的活性作为定量測定硫胺素的方法有重要意义。根据 Westenbrinke 拟定的微量方法，可以測定 0.00005 γ 輔羧化酶⁽¹⁶⁾。关于硫胺素測定法的評述，可參閱参考书目⁽¹⁷⁾。

器材 (1) 試管及試管架；(2) 小漏斗；(3) 10 毫升量筒；(4) 2 毫升吸量管；(5) 1 毫升吸量管。

試剂 (1) 米糠；(2) 0.1N 硫酸；(3) 重氮試剂^[33]；(4) 碳酸氫鈉碱性溶液^[34]；(5) 0.2% 硫胺素溶液；(6) 1% K₃Fe(CN)₆ 溶液；(7) 30% 氫氧化鈉溶液；(8) 异丁醇。

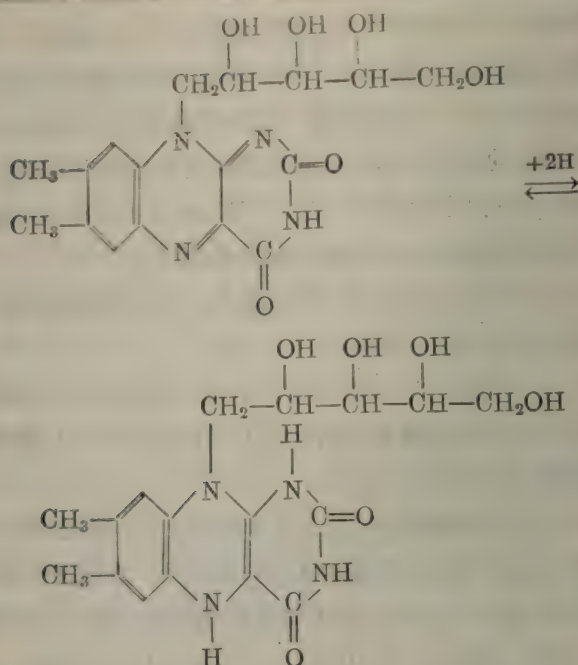
操作 (1) 重氮苯磺酸反应：取米糠約 1 克，置試管中。加入 0.1N 硫酸 5 毫升，并用力振蕩，以提取硫胺素。放置 10 分钟后，用滤紙过滤。取滤液 1 毫升，加入碳酸氫鈉碱性溶液 1.5 毫升及重氮試剂 1 毫升。搖匀后，在 10 分钟內观察深紅色的出現。

(2) 螢光反应：取 0.2% 硫胺素溶液 1—2 毫升，加入 K₃Fe(CN)₆ 溶液 2 毫升及 30% 氫氧化鈉溶液 1 毫升。充分混匀后，再加入 2 毫升异丁醇，好好振蕩。俟两液相分开后，观察上层异丁醇溶液中的藍色螢光^①。

实验二十五 維生素 B₂ 的定性試驗

維生素 B₂ 的水及酒精中性溶液为黃色，并具有很強的螢光。这种螢光在强酸和强碱中易破坏。維生素 B₂ 可被亚硫酸盐还原成无色二氧化物，失去螢光。二氧化物在空气中易重新被氧化，恢复其螢光。其反应如下。

① 观察时，不要对着阳光，而要由光入射方向观察。在紫外光下則螢光更加明显。



器材 試管及試管架。

試劑 (1)核黃素溶液(30 微克/1 毫升); (2) 2.5% NaHSO_3 溶液(用 2% Na_2CO_3 作溶劑)。

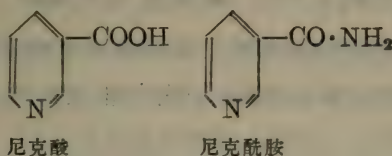
操作 取兩支試管,各加入核黃素溶液 1 毫升,觀察其黃綠色螢光。在一管中加入 5—10 滴亞硫酸氫鈉溶液,比較兩管螢光。充分搖動後,再隨時比較兩管螢光。最好在紫外光燈下觀察。

實驗二十六 尼克酸的定性試驗

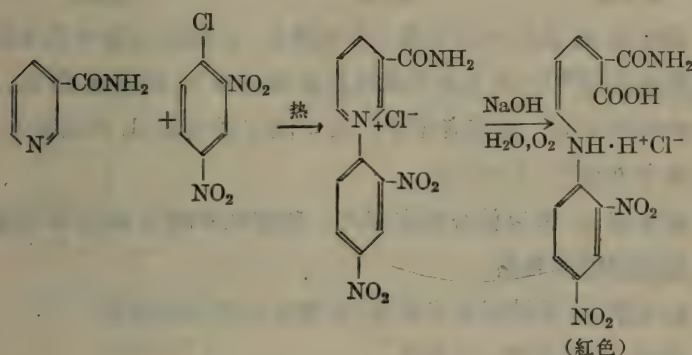
尼克酸又稱為烟酸,與尼克酰胺同為抗癩皮病維生素(或稱維生素 PP)。尼克酸在機體內可轉變成尼克酰胺,後者是輔酶 I 及輔酶 II 的組成成分。

尼克酸為白色結晶物質,易溶於水及乙醇。用酸水解尼克酰

胺可得尼克酸。



在碱性环境中尼克酸或尼克酰胺与 2,4-二硝基氯化苯结合，产生红色物质。其反应机制可能如下：



器材 (1) 試管及試管架；(2) 小蒸发皿；(3) 水浴鍋；(4) 玻璃棒。

試剂 (1) 尼克酸提取液^[35]；(2) 1% 尼克酸溶液；(3) 1% 2,4-二硝基氯化苯酒精溶液；(4) 1% 氫氧化鈉酒精溶液。

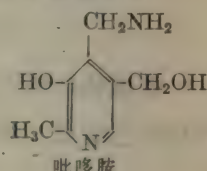
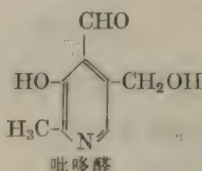
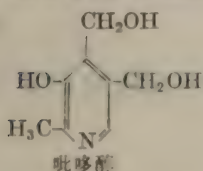
操作 傾注 2 毫升 1% 尼克酸溶液于小蒸发皿中，置水浴上蒸干。加入 1% 2,4-二硝基氯化苯溶液 2 毫升，用玻璃棒使蒸发皿中干燥物与試剂混匀，再在水浴上蒸干，并繼續加热 10 分钟。冷至室溫后，加入 1% 氫氧化鈉酒精溶液 1 毫升。顏色变紅。

用尼克酸提取液重复上述实验。

尼克酸与硫氰化溴(BrCNS)发生反应，产生黄色产物⁽¹⁸⁾。根据此顏色反应制訂的定量法⁽¹⁹⁾，应用也很广泛。

實驗二十七 維生素 B₆ 的鑑定

維生素 B₆(吡哆素)是與蛋白質代謝密切相關的維生素。吡哆醛、吡哆醇、吡哆胺三種物質具有同樣的維生素 B₆ 生理功能。



維生素 B₆ 是吡啶衍生物，含有羥基，在鹼性溶液中能與酚試劑起藍色反應⁽²⁰⁾。有人利用此反應作維生素 B₆ 的定量測定。但反應特异性不高，使用者不多。關於測定維生素 B₆ 的其他方法，參閱參考書目⁽²¹⁾。

維生素 B₆ 常以結合形式存在。磷酸吡哆醛為氨基移換酶和氨基酸脫羧酶的輔酶。

維生素 B₆ 易被鹼和光破壞，在酸性溶液中較穩定。

器材 (1)試管；(2)漏斗。

試劑 (1)米糠或酵母提取液；(2)0.01% 維生素 B₆ 溶液；(3)濃氨水；(4)Folin 氏酚試劑^[36]；(5)0.1N H₂SO₄。

操作 取約 1 克米糠置試管中，加入 0.1N 硫酸 5 毫升。用力振蕩。10 分鐘後過濾。取 1 毫升濾液，加入濃氨水 1—2 滴及酚試劑 1 滴^①。觀察顏色變化^②。

用維生素 B₆ 溶液重複試驗。

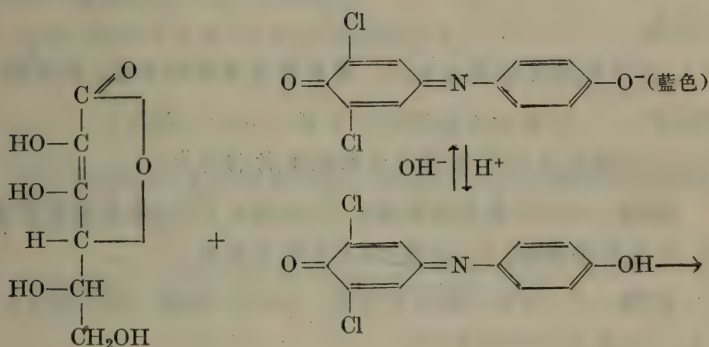
實驗二十八 維生素 C 的定量測定

維生素 C(抗壞血酸)為具有 L-系糖構型的不飽和多羥化合

① 氨水和酚試劑用量不能過多，否則，出現白色沉淀。

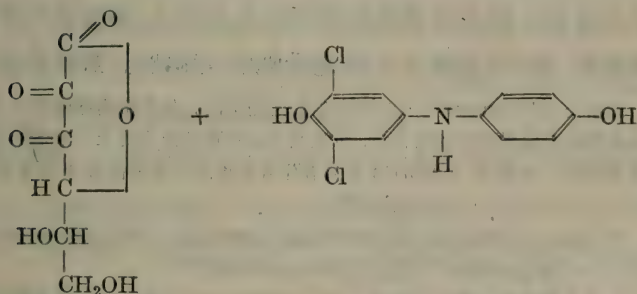
② 提取液中含有其他酚類物質，使顏色過深。

物,属于水溶性维生素。维生素C首先为 A. Szent-Gyorgyi 在 1928 年分离出⁽²²⁾。C. G. King 和 W. A. Waugh 在 1932 年确定它是抗坏血酸⁽²³⁾。维生素C分布很广,植物绿色部分及许多水果(橘类、草、山楂、辣椒等)的含量更为丰富。在碱性溶液中加热并有氧化剂存在时,抗坏血酸易被氧化而破坏。在中性和微酸性环境中^①,抗坏血酸能还原 2,6-二氯酚靛酚成为无色的还原型 2,6-二氯酚靛酚。抗坏血酸本身则被氧化成脱氢抗坏血酸。反应式如下。



抗坏血酸

2,6-二氯酚靛酚(红色)



脱氢抗坏血酸

还原型 2,6-二氯酚靛酚(无色)

① 一般认为,在 pH1.0—3.5 之间还原反应较特异。Bessey 曾提出, pH2.0—3.0 是最特异的反应范围。

利用以上反應，可以定量滴定抗壞血酸^①。從 2, 6-二氯酚靛酚標準溶液的消耗量，可以計算被檢物質中抗壞血酸含量。使用以上方法測定抗壞血酸，簡便易行，但有下列缺點。

(1) 在生物組織內和組織提取物內，抗壞血酸還能以脫氫抗壞血酸及結合抗壞血酸的形式存在。後二者同樣地具有維生素 C 的生理作用，但不能將 2, 6-二氯酚靛酚還原脫色^②。

(2) 生物組織提取物和生物體液中常含有其他還原性物質。在這些物質里，有的也可在同樣實驗條件下使 2, 6-二氯酚靛酚還原脫色。

(3) 在生物組織提取物中，常有色素類物質存在，滴定終點觀察困難。

關於維生素 C 定量測定可參閱參考書目^(24, 25)。

器材 (1) 50 毫升錐形瓶；(2) 乳鉢；(3) 5 毫升微量滴定管；(4) 10 毫升吸量管；(5) 量筒；(6) 50 毫升量瓶。

試劑 (1) 松針、橘皮或草莓；(2) 1% 鹽酸；(3) 0.001 N 標準 2, 6-二氯酚靛酚鈉溶液^[37]。

操作 用分析天平準確地稱取松針約 0.5 克，或橘皮約 4 克或草莓約 2 克。樣品必須預先用溫水洗去泥土，並在空氣中風干。放入乳鉢中，加 1% 鹽酸 5—10 毫升^③，一起研磨。放置片刻，將提

① 此法是 J. Tillmans⁽²⁶⁾ 在 1927 年首先提出的。他觀察到檸檬等水果液汁對 2, 6-二氯酚靛酚有很強烈的還原作用，可以利用這種還原能力的大小來估計水果液汁的抗壞血病活性。後來 L. J. Harris 及其合作者利用這一作用作為維生素 C 的定量測定⁽²⁷⁾。

② 有人提出，在測定前用 H_2S 使脫氫抗壞血酸還原，這樣可以測得總抗壞血酸量。但用 2, 4-二硝基苯肼法⁽²⁸⁾測定總抗壞血酸結果更好。

③ 如何從樣品中提取維生素 C，一直是研究最多的一個問題。有人使用三氯醋酸、偏磷酸、草酸、鹽酸等作為提取劑。偏磷酸和草酸較好，兩者都可以結合除去微量 Cu^{++} 和 Fe^{+++} 。這兩種離子能催化抗壞血酸被氧化。同時，偏磷酸能抑制維生素 C 氧化酶的酶促氧化作用。Schwarze 和 Guenther⁽²⁹⁾ 認為，1% 鹽酸能提出結合型維生素 C。在作一般植物樣品維生素 C 的測定時，可以使用鹽酸作提取劑。

取液滤入 50 毫升量瓶。如是反复抽提 2—3 次。最后用 1% 盐酸稀释滤液到刻度并混匀。每次量取 5 或 10 毫升进行滴定。

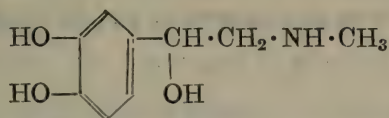
从微量滴定管中, 以 0.001N 2, 6-二氯酚靛酚钠溶液(蓝色)滴定至淡粉红色, 并保持半分钟不褪(2, 6-二氯酚靛酚在酸性溶液中呈红色)。滴定过程宜迅速, 不超过 2 分钟^①。

要使结果准确, 滴定使用的 2, 6-二氯酚靛酚钠不应少于 1 毫升或多于 4 毫升。假如滴定结果在 1—4 毫升范围以外, 则必须增减样品用量或将提取液适当稀释。

另取 1% HCl 5 或 10 毫升作对照滴定。

实验二十九 肾上腺素的提取和鉴定

肾上腺素是肾上腺髓质分泌的激素, 其化学本质为左旋型甲氨基乙醇邻苯二酚。



肾上腺素为无色结晶, 不溶于冷水和一般有机溶剂。但易溶于热水。能与酸结合成盐, 市上常见的商品为其盐酸盐。

器材 (1) 试管及试管架; (2) 乳钵; (3) 细砂子; (4) 50 毫升锥形瓶; (5) 25 毫升量筒; (6) 水浴锅。

试剂 (1) 新鲜的猪肾上腺; (2) 0.1N 盐酸; (3) 10% 醋酸; (4) 1% 三氯化铁溶液; (5) 10% 醋酸钠溶液; (6) 0.1% 氯化汞溶液; (7) Ehrlich 氏重氮试剂^[20]; (8) 浓氨水; (9) 0.2% 高硫酸钾 ($K_2S_2O_8$) 溶液。

操作 取新鲜猪肾上腺约 2 克, 置乳钵中。加入 0.1N HCl

^① 滴定要迅速。因为在本滴定条件下, 一些非维生素 C 还原物质还原作用较迟缓。快速滴定可以避免或减少它们的影响。

5 毫升和細砂少許，研磨成漿糊狀。移入 50 毫升錐形瓶中，再加 0.1N 鹽酸 15 毫升。在沸水浴中煮 5 分鐘後，加 10% 醋酸鈉液 7 毫升，再煮 1 分鐘。冷卻後，濾去（或離心除去）殘渣和蛋白質沉淀，用濾液（或上清液）作下列試驗。

(1)Vulpian 氏反應：取濾液 2 毫升，加 10% 三氯化鐵溶液 2—3 滴。溶液呈現綠色。加一滴濃氨水，液體轉變為紅色。這是典型的鄰苯二酚反應。

(2)Comessatti 氏反應：取濾液 2 毫升，加 10% 醋酸鈉溶液 1 毫升和 0.1% 氯化汞 5 滴。搖勻後，置水浴中慢慢加熱至 40—50°C。觀察玫瑰紅色的形成。

(3)Ehrlich 氏反應：取濾液 2 毫升，加入等量 Ehrlich 氏重氮試劑。搖勻後，立即加入過量的濃氨水（約 5 滴）。出現紅色。

(4)Ewins 氏反應：於 2 毫升濾液中，加入 0.2% 高硫酸鉀溶液 1 毫升。在水浴中將溶液徐徐熱至 40—50°C。觀察有無紅色出現。

實驗三十 腎上腺素對血糖含量的影響

腎上腺素在糖代謝中所起的作用與胰島素相反，能促進糖元分解成葡萄糖。給機體注射腎上腺素，則可引起高血糖症與糖尿。腎上腺素與胰島素在糖代謝上具有相成相輔的調節作用。

器材 (1)刀片；(2)2 或 5 毫升注射器；(3)0.1 毫升微量吸管；(4)小燒杯；(5)5 毫升微量滴定管；(6)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的其他器材。

試劑 (1)預先飢餓 24 小時的家兔；(2)酒精；(3)市售的腎上腺制剂 (1:1000)，用 0.9% 氯化鈉溶液稀釋 5 倍；(4)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的全部試劑。

操作 稱量預先飢餓 24 小時的家兔體重。按每公斤體重注

射肾上腺素制剂(1:1000)0.37 毫升计算, 算出稀释肾上腺素溶液的注射需要量。

注射前, 按照实验三十一的方法取血并测定家兔血糖含量, 作为对照。

将事先准备好的肾上腺素溶液, 给家兔皮下注射。30 分钟后, 再由耳静脉取血, 进行血糖测定。比较注射前后血糖含量的变化。

实验三十一 胰岛素对血糖含量的影响

胰岛素是胰脏 β -细胞所分泌的一种激素。它的化学本质是蛋白质。在机体内胰岛素具有调节糖代谢的重大作用。它能加速血糖的氧化和促进糖元合成。皮下或静脉注射胰岛素可引起血糖降低。胰岛素缺乏性糖尿病患者糖代谢发生紊乱, 血糖升高。注射胰岛素可以校正。

器材 (1)刀片; (2)2 或 5 毫升注射器(注射胰岛素用); (3)5 或 10 毫升注射器(注射葡萄糖用); (4)0.1 毫升干燥微量吸管 4 支; (5)50 毫升烧杯; (6)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的其他器材。

试剂 (1)饥饿 24 小时的家兔; (2)酒精; (3)市售胰岛素制剂(1 毫升含有 20 或 40 单位^①)用蒸馏水稀释到每毫升含 1 单位胰岛素; (4)4% 葡萄糖溶液; (5)Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法所用的全部试剂。

操作 称量预先饥饿 24 小时家兔的体重。按照每公斤体重

^① 胰岛素的生理单位是胰岛素注入事先饥饿 24 小时, 体重为 2 公斤的家兔体内时, 能引起痉挛(胰岛素性休克)的胰岛素量。此时血中葡萄糖含量可降低到 45 毫克%左右。

注射 1.5 單位胰島素^①，算出給家兔注射所需胰島素量。

取 4 個試管，各加入 0.45% 硫酸鋅溶液 5 毫升和 0.1N 氫氧化鈉溶液 1 毫升。混勻備用。

剃去兔耳部分耳毛，用酒精浸濕的棉花擦拭。干後，用刺針或刮臉刀片割破耳靜脈，迅速用干燥微量吸管吸取 0.1 毫升血液^②。擦掉吸量管尖端外部附着的血液，立即洗入第 1 號試管中。用另一吸量管同樣吸取 0.1 毫升血液并洗入第 2 號試管中。按 Hagedorn-Jensen 二氏血糖定量法測定血糖。第 3、4 號兩試管為空白對照，不加血液。

給家兔皮下注射預先準備的胰島素溶液。1 小時後，再由耳靜脈取血，同上測定血糖。不用再做空白對照。

為預防胰島素性休克，第二次取血後，立即向家兔皮下注射 40% 葡萄糖溶液 10 毫升。

比較注射胰島素前後的家兔血糖含量。

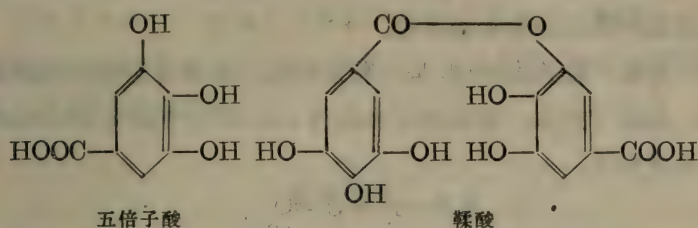
實驗三十二 鞣質的定性反應

鞣質廣泛分布于植物中。石榴皮、茶葉、五倍子（沒食子）等都含有多量鞣質，五倍子中的含量更為豐富。鞣質能鞣制生毛皮變成熟皮，鞣質的名稱即由此而來。我們祖先很早就用五倍子鞣革，至今土法制革中還在使用。

鞣質是一類糖苷，其中有的是多個鞣酸（單寧酸）分子與一個葡萄糖分子結合而成。鞣酸是二個五倍子酸（或稱沒食子酸）去水縮合產物。

① 這是能引起家兔痙攣的量的 3 倍。這樣可以很快地引起低血糖。取血後，立即注射葡萄糖，以免家兔死亡。

② 也可用注射器直接穿刺心臟取血。



器材 (1) 試管及試管架; (2) 100 毫升燒杯; (3) 乳鉢; (4) 小漏斗。

試劑 (1) 五倍子 (中药鋪中有售); (2) 1% 三氧化铁溶液; (3) 0.1% 奎宁溶液; (4) 1% 醋酸鉛溶液; (5) 1% 白明胶溶液。

操作 (1) 在中性环境中, 鞣质与三价铁盐 (三氧化铁、铁氨矾) 发生反应, 产生藍色或綠色的化合物。藍色或綠色决定于酚基的数目与位置。

取五倍子約 5 克, 放乳鉢中搗碎后, 移入燒杯中。加水 30 毫升, 煮沸 5 分钟, 过滤。取滤液 2 毫升, 滴加 1% 三氯化铁 2—3 滴。顏色怎样?

(2) 鞣质为一种植物碱試剂, 能使植物碱沉淀。取滤液 2 毫升, 滴加 0.1% 奎宁 3—4 滴。观察沉淀出現。

(3) 鞣质能被重金屬盐沉淀。取滤液 2 毫升, 加 1% 醋酸鉛溶液 3—4 滴, 立即有沉淀形成。

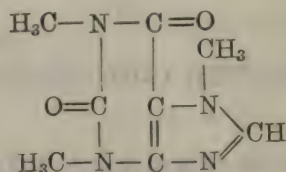
(4) 鞣质还能沉淀蛋白质。取 1% 白明胶溶液 2 毫升, 滴加滤液 2—3 滴, 即有沉淀出現。

实验三十三 茶碱的提取和一些性质

植物碱是一类特殊的碱性含氮有机化合物, 氮常存在于分子的环状结构中。植物碱微溶于水, 但易溶于微酸性溶液, 易溶于乙醇、乙醚、氯仿、苯或石油醚等有机溶剂。鞣酸、磷鉬酸、苦味酸、亚铁氰化鉀或 $KI-HgI_2$ 等試剂能使植物碱在水溶液中沉淀。因此

這些試劑被稱為植物鹼試劑。

茶鹼又稱為咖啡鹼，是一種植物鹼。茶鹼為無色針狀結晶，味苦，易溶于熱水。它的化學名稱為 1, 3, 7-三甲基 2, 6-二氧嘌呤，結構式如下：



干茶葉中含茶鹼 3—5%。

器材 (1)試管及試管架；(2)漏斗；(3)小蒸發皿；(4)100 毫升燒杯；(5)尖端較細的滴管；(6)載玻片；(7)顯微鏡。

試劑 (1)茶葉；(2)氯仿；(3)市售茶鹼；(4)鞣酸飽和溶液；(5)碘化鉀-碘化汞溶液^[22]。

操作 稱取茶葉 2 克，放入燒杯內。加蒸餾水 50 毫升，煮沸 30 分鐘。趁熱過濾，將濾液倒入蒸發皿中，放在水浴上蒸干。

用氯仿 2 毫升溶解蒸發皿內的干燥物質，並將溶液倒入試管中。用蒸餾水反復洗滌試管中的氯仿溶液，直至把褐色物質洗淨為止。用水洗滌時，每次用 2 毫升。每次洗完后，用細尖滴管將水吸出拋棄之。

用滴管把氯仿溶液小心地滴到載玻片上，每滴一滴即用微火烘干。在顯微鏡下觀察茶鹼的針狀結晶。

茶鹼能升華。取另一玻片放在載有茶鹼的玻片的上方，但不接觸。用小火微微加熱后，就可發現上面的玻璃片有針狀結晶出現。

取 2 支試管，各加茶鹼結晶一小粒。于一試管內加氯仿 1 毫升，于另一試管內加冷水 1 毫升。振蕩，觀察溶解現象。將加有冷水的試管加熱，有何變化？

另取 2 支試管, 各加入茶碱結晶数粒及蒸餾水 2 毫升。于一試管内滴加鞣酸饱和溶液, 另一試管内滴加碘化鉀-碘化汞溶液各数滴。观察沉淀的形成。

参考书目

- (1) Carr, F. H. and Price, E. A., *Biochem. J.*, **20**, 498 (1926).
- (2) Yudkin, S., *Biochem. J.*, **35**, 551 (1941).
- (3) 食物营养成分测定法, 中国医学科学院劳动卫生劳动保护及职业病研究所营养学系編, 46 頁 (1961).
- (4) Sebrell, W. H. and Harn, R. S., *The Vitamins*, Vol. I, p. 87 (1954).
- (5) Nield, C. H., Russell, W. C. and Zimmerli, A., *J. Biol. Chem.*, **136**, 73 (1940); **148**, 245 (1943).
- (6) Koch, F. C. and Hanke, M. E., *Practical Methods in Biochemistry*, 6th Ed., p. 418 (1953).
- (7) Sobel, A. E. et al., *Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 160 (1945).
- (8) Sebrell, W. H. and Harn, R. S., *The Vitamins*, Vol. II, p. 215 (1954).
- (9) Pauly, H., *Z. Physiol. Chem.*, **42**, 508 (1904).
- (10) Kinnersley, H. W. and Peters, R. A., *Biochem. J.*, **28**, p. 667 (1934).
- (11) Prebluda, H. T. et al., *Science*, **84**, 488 (1936); *J. Biol. Chem.*, **127**, 495 (1939).
- (12) Melnick, D. et al., *J. Biol. Chem.*, **127**, 505, 515, 531 (1939).
- (13) Emmett, A. D. et al., *J. Biol. Chem.*, **135**, 131 (1940).
- (14) Hochberg, M. and Melnick, D., *J. Biol. Chem.*, **156**, 53 (1944).
- (15) Hennessy, D. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 171 (1939); *Ind. and Eng. Chem., Anal. Ed.*, **13**, 216 (1941).
- (16) Westenbrinke, H. G. K., *Enzymologie*, **8**, 97 (1940).
- (17) 如 (8) Vol. II, p. 448 (1954).
- (18) Melnick, D. and Field, H., Jr., *J. Biol. Chem.*, **134**, 1 (1940).
- (19) György, D. P. (Editor), *Vitamin Methods*, Vol. I, p. 217 (1950).
- (20) Folin, O. and Denis, W., *J. Biol. Chem.*, **22**, 305 (1915).

- (21) 如(17) p. 244.
- (22) Szent-Gyorgyi, A., *Biochem. J.*, **22**, 1387(1928).
- (23) Waugh, W. A. and King, C. G., *J. Biol. Chem.*, **97**, 325(1932).
- (24) 如(4) p. 177.
- (25) 如(19), Vol. I, p. 260—276; Vol. II, p. 671—678(1951)
- (26) Tillmans, J., *Z. Untersuch. Lebensm.*, **54**, 33(1927).
- (27) Harris, L. J. and Ray, S. N., *Biochem. J.*, **27**, 303, 590(1933).
- (28) Roa, T. H. and Kuether, O. A., *J. Biol. Chem.*, **147**, 399(1943).
- (29) Schwarze W. K., and Guanter, E., *Biochem. Z.*, **319**, 139(1948).

第五章 酶

酶(酵素)是生物体中具有催化功能的蛋白质,因此,也叫做生物催化剂。它們能加快反应的进程,但不参加到反应的最終产物。按其催化功能,酶可分为五大类:(1)催化水解作用的酶称为水解酶,如蛋白酶和脂肪酶;(2)催化氧化还原作用的酶称为氧化还原酶,如酪氨酸酶和琥珀酸脱氢酶;(3)催化分子分裂的酶称为分裂酶,如碳酸酐酶;(4)催化分子間基团移換的酶称为移換酶,如氨基移換酶;(5)催化分子异构化的酶称为异构酶和催化分子內基团变位的变位酶,如UDPG 异构酶和磷酸葡萄糖变位酶。

一般來說,水解酶是在物理化学性质上与球蛋白相近似的单纯蛋白质,氧化还原酶是結合蛋白质。目前許多酶已能制成晶体。

酶具有高度特异性。溫度和 pH 对酶的活性有显著影响。能使酶活性增加的一些物质称为酶的激动剂,能使酶活性减低的一些物质称为酶的抑制剂。激动剂与抑制剂常表現某种程度的特异性。

物质代謝是生命的基本特征。在机体中不断地进行着的同化作用和异化作用中,有多种不同的化学变化。这些化学变化絕大多数都在酶的影响下进行。工业部門中的食品工业、发酵工业、制药工业、制革和造纸工业等都和酶有密切关系。因此,酶的研究在生物化学中占有极重要的位置。

实验三十四 酶的特异性

与一般催化剂比較,酶具有高度特异性。有时一种酶仅对一个底物起一定的催化作用。特异性較低的酶則能对一类化合物起

催化作用,这些化合物常具有相同的化学键。例如,淀粉酶能催化淀粉水解,但不能催化脂肪水解,而脂肪酶则能催化脂肪水解,而不能催化淀粉水解。虽然这二种酶所催化的都是水解过程,但是它们要求的作用底物不同,水解破裂的化学键也不同。

大多数酶都具有立体化学特异性。精氨酸酶可作为一个例子来说明。这个酶能催化 L-精氨酸成 L-鸟氨酸和尿素,但不能作用于 D-精氨酸。

本实验以唾液酶(含淀粉酶及少量麦芽糖酶)和蔗糖酶对淀粉和蔗糖的作用为例,来说明酶的特异性。

淀粉和蔗糖缺乏自由醛基,无还原性,但在唾液酶的作用下,淀粉很容易水解成有还原性的麦芽糖和一些葡萄糖。在同样情况下,唾液酶不能催化蔗糖的水解。蔗糖酶能催化蔗糖的水解,产生还原性葡萄糖和果糖,但不能催化淀粉的水解。

器材 (1)试管及试管架;(2)恒温水浴锅。

试剂 (1)2%蔗糖溶液;(2)新配制的、溶于0.3%氯化钠的1%淀粉溶液;(3)稀释200倍之新鲜唾液①;(4)蔗糖酶溶液^[38]。

操作 (1)淀粉酶的特异性:先以 Benedict 氏试剂鉴定蔗糖和淀粉是否含有还原性杂质。

取2支试管,各加入 Benedict 氏试剂2毫升,再分别加入1%淀粉溶液和2%蔗糖溶液各4滴。混合均匀后,放在沸水浴中煮2—3分钟。观察有无红黄色沉淀产生。纯净的淀粉和蔗糖不呈阳性反应。

取2支试管,向一试管中加1%淀粉3毫升,另一试管中加入2%蔗糖溶液3毫升。向2支试管各添加稀释200倍的新鲜唾液1毫升。混匀,放入37°C恒温水浴中。15分钟后取出,以 Benedict

① 不同人和不同时刻的唾液中淀粉酶的活性不同,差别有时很大。稀释倍数可以是100—200倍。

氏試剂分別檢查二管的內容物，并記錄結果。

(2) 蔗糖酶的特异性：向 1 支試管中加入 1% 淀粉溶液 3 毫升，向另 1 支試管中加入 2% 蔗糖溶液 3 毫升。再向 2 支試管中分別加入蔗糖酶溶液各約 1 毫升。搖勻后，放入 37°C 恒溫水浴中保溫。10 分钟取出，用 Benedict 氏試剂檢查 2 支試管的內容物。記錄并解釋結果^①。

實驗三十五 唾液淀粉酶的激动和抑制

酶的活性常受某些物质的影响，有些物质能增高酶的活性，有些物质則能减低酶的活性。前者通常称为酶的激动剂，后者称为抑制剂。激动剂与抑制剂影响酶作用的需要量很小，并常具有特异性。

氯化鈉为唾液淀粉酶的激动剂，硫酸銅为其抑制剂。激动剂和抑制剂的作用不是絕對的，有些物质在低濃度时为激动剂，而在高濃度时則为抑制剂。如氯化鈉达到 $\frac{1}{3}$ 饱和度时就可抑制唾液淀粉酶的活性。

器材 (1) 試管及試管架；(2) 恒溫水浴鍋及溫度計。

試剂 (1) 0.1% 淀粉溶液；(2) 稀釋 100—200 倍的新鮮唾液；(3) 1% 氯化鈉溶液；(4) 0.1% 硫酸銅溶液；(5) 碘化鉀-碘溶液^[39]。

操作 取 3 支試管，各加入 3 毫升 0.1% 淀粉溶液和 1 毫升稀釋唾液。向第 1 支試管中加入 1 毫升 1% 氯化鈉溶液，向第 2 支試管中加入 1 毫升 0.1% 硫酸銅溶液。向第 3 支試管中加入 1 毫升蒸餾水作对照。

搖勻各管內容物，一齐放入 37°C 恒溫水浴中保溫。15 分钟

^① 蔗糖酶溶液中有少量还原性杂质。因此，在使用淀粉作底物的試驗中，也呈現輕度 Benedict 反应。可以使用煮过的蔗糖酶另做一个补充試驗，证明蔗糖酶溶液中含有还原性杂质。

后,取出①。冷后,分别滴入2—3滴碘化钾-碘溶液。观察比较3支试管颜色的深浅,并解释之。

实验三十六 温度对酶活性的影响

酶的催化作用受温度的影响。酶所催化的化学反应表现有最适温度现象。在最适温度下,酶反应速度最高。较高或较低的温度能使酶反应速度降低。大多数动物酶的最适温度为37—40°C,植物酶的最适温度为50—60°C。

温度对酶催化的化学反应过程具有双重效应。一方面,温度上升可以使反应加快;另一方面,加快酶本身的“热失效”。在实际测定任何一个酶的最适温度时,必须同时注意时间因素,因为在一定温度下,时间越长,温度对酶的破坏越大。

酶对温度的稳定性与其存在形式有关。有些酶的干燥制剂虽加热到100°C,其活性并无明显改变,但在100°C溶液中却很快地完全失去活性。

低温能降低或抑制酶的活性,但不能使酶失去活性。

器材 (1)试管及试管架;(2)恒温水浴锅及温度计。

试剂 (1)新配制的、溶于0.3%氯化钠的0.2%淀粉溶液;(2)稀释200倍的唾液;(3)碘化钾-碘溶液^[39];(4)1%尿素溶液;(5)脲酶提取液^[40];(6)Nessler氏试剂^[41]。

操作 (1)温度对唾液酶活性的影响:淀粉和可溶性淀粉遇碘呈蓝色。糊精按其分子的大小,遇碘可呈蓝色、紫色、暗褐色和红色。最简单的糊精遇碘不呈现颜色,麦芽糖遇碘也不呈现颜色。在不同温度下,淀粉被唾液酶水解的程度,可由水解混合物遇碘呈现的颜色来判断。

① 由于酶的活性不同,保温水解最适合的时间不同。根据实验三十四的经验,确定保温时间。一般10—15分钟较适合。

取 3 支試管各加淀粉溶液約 2 毫升。向第 1、第 2 兩試管中，各加稀釋唾液 1 毫升，向第 3 号試管中添加煮过的稀釋唾液 1 毫升。搖勻后，將第 1、第 3 兩試管放入 37°C 恒溫水浴中，第 2 号試管放入冰水中。20 分钟取出，用碘化鉀-碘溶液来檢驗淀粉被唾液酶水解的程度。記錄并解釋結果。

(2) 溫度对脲酶活性的影响：脲酶催化尿素水解生成 NH_3 和 CO_2 ， NH_3 可与 Nessler 氏試剂結合生成橙紅色化合物。由顏色的深淺，可看出反应的进行程度。

取試管 4 支。在第 1、第 2 和第 3 三个試管中各加脲酶提取液 1 毫升，在第 4 号試管中加預先煮过的脲酶提取液 1 毫升。將第 2 号試管放在冰水里 5 分钟，使其冷却。最后向 4 支試管内各加 1 毫升 1% 尿素溶液。混勻，將第 1 和第 4 兩試管放置在室溫下，第 3 号試管放在 50°C 恒溫水浴中，第 2 号試管仍放回冰水中。10 分钟后，取出第 2 和第 3 兩管，并用水管流水冲冷至室溫。向 4 个試管中各加 Nessler 試剂 5 滴，并搖勻。观察比較各試管顏色的深淺。

实验三十七 pH 对酶活性的影响

酶的活性，受环境 pH 的影响极为显著。通常只在一定的 pH 範圍內，酶才表現它的活性。一种酶活性表現最高时的 pH 值为該酶的最适 pH。低于或高于最适 pH 时酶的活性漸次降低。应当指出，酶的最适 pH 受底物性质和緩冲液性质的影响。

图 8 表示唾液淀粉酶活性与 pH 的关系。

不同酶的最适 pH 值不同，但与

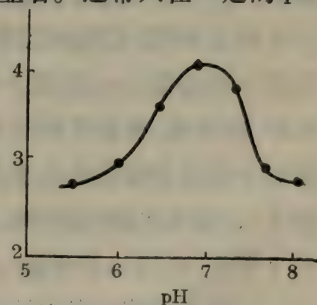


图 8. pH 对唾液淀粉酶活性的影响。

該酶在有机体存在部位的 pH 似有一致关系。例如高等动物的胃蛋白酶最适 pH 为 1.5—2.5, 而胃液的 pH 与此相近。胰蛋白酶的最适 pH 为 8 左右, 而十二指肠附近腸道的 pH 值近乎中性。

本实验使用唾液淀粉酶来说明 pH 对酶活性的影响。唾液淀粉酶的最适 pH 约为 6.8。有人发现, 在磷酸缓冲溶液中, 其最适 pH 为 6.4—6.6, 而在醋酸缓冲溶液中则为 5.6。

器材 (1) 試管及試管架; (2) 滴定管; (3) 2 毫升和 5 毫升吸量管; (4) 50 毫升錐形瓶; (5) 恒溫水浴鍋。

试剂 (1) 新配制的, 溶于 0.3% NaCl 的 0.5% 淀粉溶液; (2) 稀釋 200 倍的新鮮唾液; (3) 0.2M 磷酸氫二鈉液; (4) 0.1M 檸檬酸溶液; (5) 碘化鉀-碘溶液^[39]。

操作 取 8 个标有号碼的 50 毫升錐形瓶。由滴定管按下表比例添加 0.2M 磷酸氫二鈉溶液和 0.1M 檸檬酸溶液, 制备 pH 5.0—8.0 的 8 种缓冲溶液。

由 8 个錐形瓶中, 各取缓冲液 3 毫升, 分別注入 8 支帶有号碼的試管中。随后于每个試管中, 添加 0.5% 淀粉溶液 2 毫升和稀釋 200 倍的唾液 2 毫升。(增加一个与 5 号內容相同的試管, 作为檢驗淀粉的水解程度)。向各試管加入稀釋唾液的时间間隔各为 1 分钟。将各試管內容物混勻, 并依次置于 37°C 恒溫水浴中保溫。

10 分钟后(視酶的活性而定, 一般 5—10 分钟), 每隔 1 分钟由第 5 号試管之一, 取出一滴混合液, 置于白磁板上, 加一小滴碘化鉀-碘溶液, 檢驗淀粉的水解程度, 俟实验結果成为橙黄色时(掌握第 5 管的水解程度是本实验成敗关键之一), 向所有試管依次添加 1—2 滴碘化鉀-碘溶液, 充分混勻。加碘化鉀溶液时间間隔, 由第 1 管起, 也均为 1 分钟。

根据各試管內容物呈現的顏色, 可以看出 pH 对唾液淀粉酶活性的影响。

錐形瓶號碼	0.2M 磷酸氫二鈉 (毫升)	0.1M 檸檬酸 (毫升)	pH
1	5.15	4.85	5.0
2	6.05	3.95	5.8
3	6.61	3.39	6.2
4	7.28	2.72	6.6
5	7.72	2.28	6.8
6	8.24	1.76	7.0
7	9.08	0.92	7.4
8	9.72	0.28	8.0

實驗三十八 脂肪酶的定性試驗

脂肪酶能催化水解脂肪成甘油与脂肪酸。脂肪酸的生成可用酸碱指示剂来檢驗。

牛乳中的脂肪分散在水相中呈乳状液，容易被脂肪酶水解。本实验观察：

(1) 胰脂肪酶对牛乳中脂肪的水解作用。

(2) 蓖麻子脂肪酶对蓖麻油的水解作用。錳离子对此酶有激活作用。

器材 (1) 試管及試管架；(2) 10 毫升量筒；(3) 1 毫升和 2 毫升吸量管；(4) 乳鉢及杵；(5) 剪刀；(6) 恒溫水浴鍋。

試剂 (1) 牛乳；(2) 新鮮猪 (或牛) 胰腺；(3) 甘油水溶液 (1:3)；(4) 0.1N 氫氧化鈉溶液；(5) 1% 酚酞酒精溶液；(6) 蓖麻子。

操作 (1) 将猪胰用溫水洗淨。剔除脂肪和結締組織后，剪碎。称取碎块約 5 克，置于乳鉢中。加甘油水溶液 10 毫升，仔細磨成糊状。用浸湿的麻布将提取液滤入試管内。

另取 2 支試管，各加 2 毫升牛乳和 1 毫升胰提取液。将一試管煮沸 2—3 分钟。煮后用自来水冲冷。向 2 支試管内各加 2 滴 1%

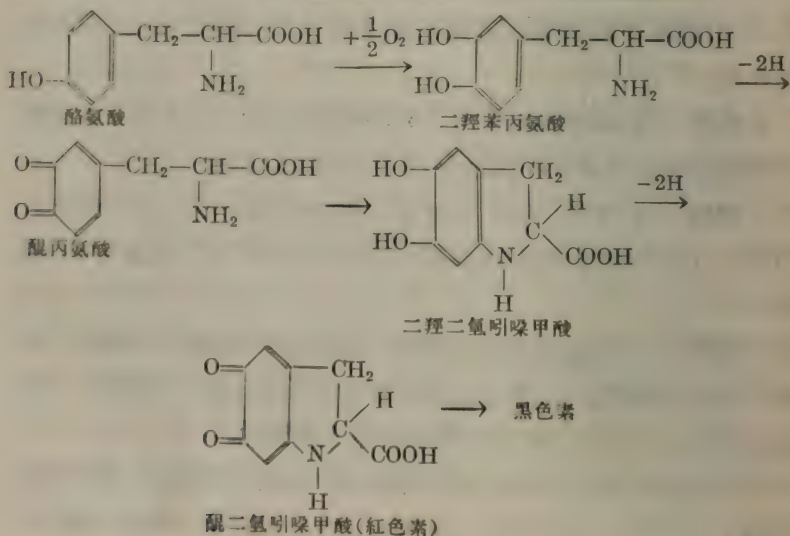
酚酞溶液，并以 0.1N 氢氧化钠溶液中和至呈微红色（不能过红）。用木塞塞紧试管，并置于 37—40°C 恒温水浴中保温半小时。随时注意试管内颜色的变化，并记录时间。

(2) 取蓖麻子 5—10 粒，剥去外皮。加 5 毫升甘油水溶液，仔细磨成糊状。分装入 2 支试管，将一试管煮沸 5 分钟，煮后用自来水冲冷。其余操作同前。

实验三十九 氧化酶的定性反应

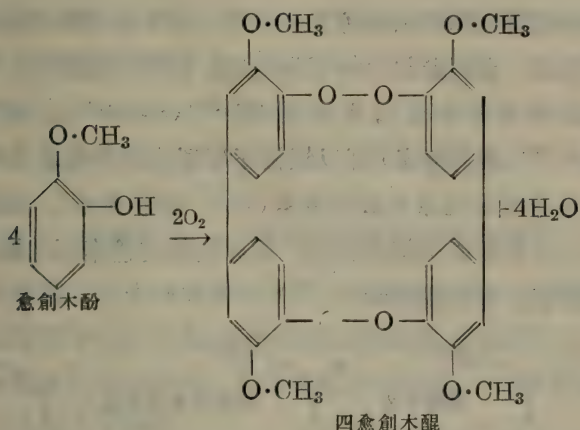
氧化酶能催化分子氧直接氧化底物。酪氨酸酶为生物界分布很广的一种氧化酶，它催化酪氨酸被氧氧化。在马铃薯块茎的外层、甜菜和谷物及真菌中含量都很高。酪氨酸酶特异性不甚严格，能促进多种单酚及多酚的氧化作用。在弱碱性环境中，其活性最强。

酪氨酸等酚类衍生物，受酪氨酸酶的催化氧化先形成红色色素，然后继续氧化生成黑色素类物质。一部分反应过程如下：



从紅色素轉变为黑色素不需要酪氨酸酶。在沒有酪氨酸酶存在时,空气中的氧即能导致这样的轉变。

酪氨酸酶能催化愈創木脂中的愈創木酸氧化, 生成藍色的臭氧化物。



本实验利用此顏色反应, 作酪氨酸酶的定性鉴定。

器材 (1)試管及試管架; (2)乳針及杵; (3)小刀; (4)玻璃漏斗; (5)恒溫水浴鍋。

试剂 (1)生馬鈴薯; (2)溶于 0.01N 碳酸鈉的 0.5% 酪氨酸溶液^[42]; (3)愈創木脂酒精溶液^[43]。

操作 (1)取生馬鈴薯約 5 克, 用小刀去皮后切成碎块。放入乳針中, 加蒸餾水約 10 毫升, 研碎并将提取液过滤。

取約 3 毫升 0.5% 酪氨酸溶液, 傾入試管中, 加馬鈴薯提取液約 1 毫升, 振蕩并放入 35—40°C 之水浴中保溫。时时振蕩, 使空气充分与溶液接触。試管内容物漸漸經過淡紅色、棕紅色、褐色, 最后变成黑色(約需 1—2 小时)。

(2)在生馬鈴薯切片上滴加愈創木脂溶液数滴, 观察藍色出現。在切片邊緣接近表皮处, 藍色应較为显著。用煮熟的馬鈴薯

可以不断地进行。KCN 抑制细胞色素氧化酶。

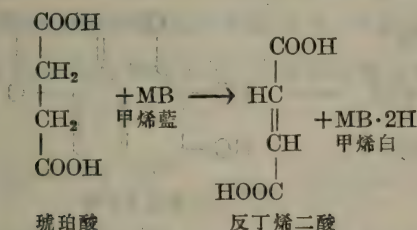
器材 玻璃表面皿。

试剂 (1)1% α -萘酚酒精溶液；(2)1%对苯二胺水溶液；(3)0.01M KCN 溶液(剧毒!)。

操作 取二表面皿，各加一块肝切片(或肌肉或马铃薯切片)。在一个表面皿的切片上加几滴 0.01M KCN 溶液，再在两表面皿切片上各加几滴 α -萘酚酒精溶液-对苯二胺水溶液的等体积混合液。如有蓝色出现，则说明有细胞色素和细胞色素氧化酶存在。

实验四十一 琥珀酸脱氢酶活性的测定

以脱氢方式使物质氧化的酶，称为脱氢酶。琥珀酸脱氢酶是三羧酸循环中的一个酶，能促使琥珀酸脱氢成为反丁烯二酸，并将脱下的氢传递给受氢体。用甲烯蓝作受氢体，结果甲烯蓝被氢还原生成无色的甲烯白。



在无氧环境下，琥珀酸脱氢酶的活性与甲烯蓝脱色速度成正比。使定量甲烯蓝脱色所需时间的倒数，可以用来表示酶的活性。

本实验用冻结琼脂制造无氧环境^①。这样，可以不用真空设备或氮气。

器材 (1)试管及试管架；(2)恒温水浴锅；(3)1毫升和2毫升吸量管；(4)烧杯。

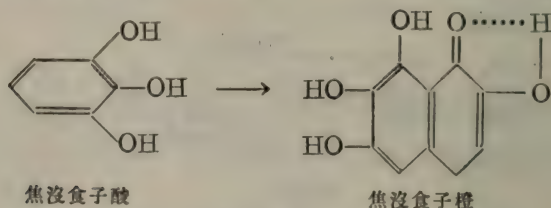
① 如不用琼脂，可以用液体石蜡封盖反应液面，或使用 Thunberg 管。

試劑 (1)0.01% 甲烯藍溶液; (2)0.02M 琥珀酸溶液(中和到對石蕊試紙呈中性); (3)2% 琼脂溶液^[44]; (4)肌肉糜^[45]。

操作 取 2 支試管, 各加 0.02M 琥珀酸溶液 0.5 毫升、0.01% 甲烯藍溶液 1 毫升和 45°C 的 2% 琼脂溶液 2 毫升。再分別加入 0.5 克肌肉糜和煮過的肌肉糜。混勻后, 在冰中冷卻, 使琼脂凍成凝膠。將試管放入 37°C 水浴中保溫, 隨時觀察并記錄甲烯藍脫色過程和時間。

實驗四十二 过氧化物酶的定性反应

过氧化物酶能催化过氧化氢对某些物质的氧化。过氧化物酶的特异性不甚严格, 各种多酚或芳香族胺均可在此酶作用下, 被过氧化氢氧化。愈創木脂中的愈創木酸可被氧化成为藍色的愈創木酸臭氧化物, 焦性沒食子酸(邻苯三酚 $[C_6H_3(OH)_3]$)則被氧化生成橙紅色的焦沒食子橙沉淀。



过氧化物酶广泛地存在于植物組織中。

器材 (1)試管及試管架; (2) 2 和 5 毫升吸量管。

試劑 (1)0.3% 焦性沒食子酸水溶液; (2)2% 过氧化氢溶液; (3)白菜提取液^[46]; (4)愈創木脂酒精溶液^[43]。

操作 (1)加白菜提取液約 5 毫升于試管内, 煮沸 2—3 分钟后, 冷卻。

取 4 支标有号碼的試管, 各加 0.3% 焦性沒食子酸溶液約 3 毫升。第 1 試管, 加 2% 过氧化氢 2 滴及蒸餾水 2 毫升。第 2 試管,

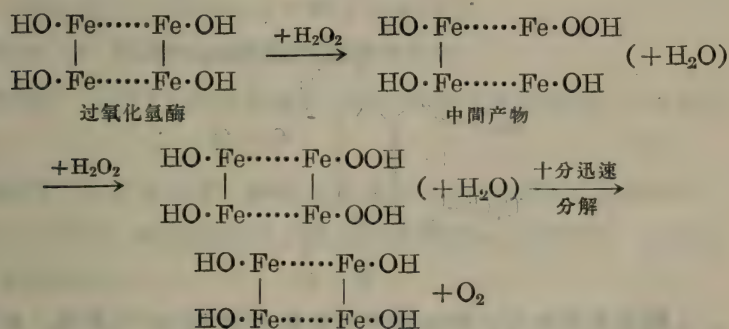
加白菜提取液 2 毫升。第 3 试管，加 2% 过氧化氢 2 滴及白菜提取液 2 毫升。第 4 试管，加 2% 过氧化氢 2 滴及煮过的白菜提取液 2 毫升。摇匀后，观察并记录各管颜色变化和沉淀的出现。

(2) 取试管 2 支，各加愈创木脂溶液及 2% 过氧化氢溶液各 0.5 毫升。并分别加入白菜提取液和煮过的白菜提取液各几滴。观察并记录结果。

实验四十三 过氧化氢酶的定性反应

在生物机体內，某些代谢物由于需氧脱氢的结果而产生对机体有毒害作用的过氧化氢。过氧化氢酶能催化过氧化氢分解成水和分子氧。因此，过氧化氢酶具有保护生物机体的作用。

过氧化氢酶按其化学本质属于复合蛋白，其辅基是血色素。在催化过程中，一分子过氧化氢酶先与一分子过氧化氢结合。生成的中间产物既有过氧化氢酶作用，也有过氧化物酶作用；能催化另一个过氧化氢分子分解生成水和氧分子，也能氧化甲醇成为甲醛。在机体中，过氧化氢的浓度很低，过氧化氢酶可能主要起过氧化物酶的作用。



过氧化氢酶广泛地存在于动、植物组织中。它的抗热性较低，最适温度为 0—10°C。

器材 試管及試管架。

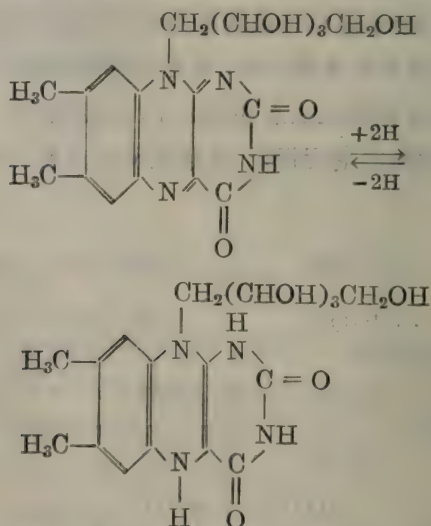
試劑 (1)2%过氧化氢溶液;(2)新鮮猪肝糜;(3)生馬鈴薯。

操作 (1)取2支試管,各加3毫升新配制的2%过氧化氢溶液。向1支試管中加磨碎的新鮮猪肝糜少許,向另1支試管中加約等量的、煮过的猪肝糜。观察有无气泡放出,特別注意肝糜的周圍。

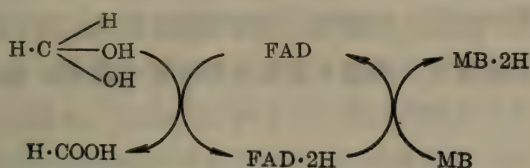
(2)用生馬鈴薯和熟馬鈴薯重复以上实验。可用馬鈴薯糜浆,也可用馬鈴薯小块。

实验四十四 黄酶的定性試驗

黄酶是以黄素核苷酸(FMN或FAD)为輔基的复合蛋白质——黄素蛋白。某些黄酶还含有铁、銅或鋇。分子中核黄素部分能与氢原子可逆地結合,从而起递氢作用:



属于黄酶的有:能使还原型輔酶($\text{CoI} \cdot \text{H}_2$ 和 $\text{CoII} \cdot \text{H}_2$)脱氢的黄酶、氧化黄嘌呤成尿酸的黄嘌呤氧化酶、氨基酸氧化酶等。牛乳中的黄嘌呤氧化酶能催化水合甲醛把氢交给甲烯蓝。



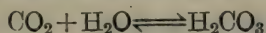
器材 試管及試管架。

試劑 (1)鮮牛乳；(2)1%甲醛溶液；(3)0.02%甲烯藍溶液。

操作 取2支試管，各加入1毫升1%甲醛溶液和0.5毫升0.02%甲烯藍溶液，再分別加入5毫升新鮮牛乳和煮沸的牛乳。放在40°C恒溫水浴中保溫。观察甲烯藍退色，并記錄時間。

實驗四十五 碳酸酐酶的定性試驗

碳酸酐酶屬於分裂酶类，它催化下列反应：



紅血球中的碳酸酐酶在血液傳遞 CO_2 中具有重要作用。組織中產生的 CO_2 擴散到血漿并進入紅血球，在碳酸酐酶的作用下轉變成碳酸。在肺中，碳酸又在碳酸酐酶的作用下分解成 CO_2 和 H_2O ， CO_2 從紅血球擴散到血漿并進入肺泡，呼出體外。

碳酸酐酶在胃酸的形成中亦有重要作用。

器材 (1)試管和試管架；(2)小玻璃管。

試劑 (1)0.1%酚紅溶液；(2)0.02M碳酸氫鈉溶液；(3)新鮮血液。

操作 取2支試管，各加入5毫升0.02M碳酸氫鈉溶液和一滴酚紅指示劑。溶液顯紅色。通過小玻璃管吹入呼出氣，直至溶液成黃色為止。

取4滴血液，用10毫升蒸餾水沖稀并混勻。取一半煮沸并冷卻。立刻用吸量管把1毫升稀釋的血液移入第1個試管中，把1毫升煮過的血液移入另一試管中。然後在兩試管中各加入2滴

0.05N NaOH 溶液，并搖匀。两試管应显紅色。第 1 試管中顏色很弱并很快地消失，而第 2 試管中顏色改变很慢。記錄并解釋結果。

實驗四十六 蛋白酶活性的測定

酶的活性，可根据轉化一定量作用物所需的時間來計算，也可根据在一定時間內为酶催化轉化的作用物的量來計算。

胃蛋白酶能催化水解蛋白质，其最适 pH 为 1.5—2.5。胃蛋白酶可特异地拆开由酪氨酸的氨基和二羧基氨基酸的羧基所形成的肽鍵，生成自由酪氨酸及含有酪氨酸的肽。我們可以使胃蛋白酶在一定条件下作用于一种蛋白质，加三氯醋酸除去未消化的蛋白质后，再用 Folin 氏試剂測定滤液內酪氨酸含量。滤液中的酪氨酸含量可作为胃蛋白酶活性的量度。

Anson⁽¹⁾(1932)曾用血紅蛋白为底物測定胃蛋白酶的活性。本实验采用鸡蛋清蛋白为底物。

器材 (1)50 毫升錐形瓶；(2)1 毫升、2 毫升、5 毫升和 10 毫升吸量管；(3)漏斗；(4)試管及試管架；(5)恒溫水浴鍋；(6)光电比色計。

試剂 (1)酸性鸡蛋清蛋白溶液^[47]；(2)溶在 0.2% 盐酸中的 1% 的胃蛋白酶溶液；(3)5% 三氯醋酸溶液；(4)0.5N 氢氧化鈉溶液；(5)Folin 氏試剂^[86]；(6)标准酪氨酸溶液(0.2 毫克/毫升)。

操作 取 2 个 50 毫升錐形瓶，各加入 5 毫升酸性清蛋白溶液。在一錐形瓶中添加 1 毫升 1% 胃蛋白酶溶液，将 2 个錐形瓶放入 37°C 恒溫水浴內保溫。10 分钟后取出，各添加 10 毫升 5% 三氯醋酸溶液，搖匀，并于第 2 个瓶(对照实验)中加 1 毫升 1% 胃蛋白酶溶液，再搖匀。靜置 15 分钟后过滤。

取消化样品及对照实验滤液各 2 毫升，分別置于两試管內。

另取 1 支試管，加 0.3 毫升标准酪氨酸^①及 2 毫升对照实验管滤液。向以上 3 支試管中各加 5 毫升 0.5N 的氢氧化鈉溶液^②和 1 毫升 Folin 氏試剂。在碱性液中，Folin 氏試剂很易分解^③，因此，每次添加 Folin 氏試剂应尽可能地快，并保持速度一致；加完后，立即充分搖混。靜置 30 分钟后，用黃色滤光板(580 毫微米)在光电比色計上測光密度。使对照管的光密度为零。由各管溶液的光密度^③求出生成的酪氨酸量，并表示胃蛋白酶的活性。

参考书目

- (1) Anson, H. L., J. Gen. Physiol., 22, 79(1938).
- (2) Lowry, O. H. et al., J. Biol. chem., 193, 265(1951).

① 先将 20 毫克酪氨酸溶于 0.1N 盐酸中，轉入 100 毫升容量瓶，并稀釋到刻度。

② 碱度对顏色的影响很大。氢氧化鈉的濃度不足 0.5N 时，溶液呈不正常的草綠顏色。

③ 如消化样品管的光密度大于标准酪氨酸管的光密度，必須将消化滤液适当稀釋后重測光密度。只在一定范围内，光密度才与酪氨酸量成正比。

第六章 組織代謝

生物机体在其全部生命活动过程中，經常不断地与其周围环境进行物质交换。它一方面摄取外界物质，經過一系列的化学变化，改造成自身的組織；另一方面分解体内物质，产生能量，并将分解产物排出体外。生物机体的这种物质变化过程称为物质代謝。

生物体内物质代謝的各个方面是相互联系、相互制約的。例如，糖代謝、脂肪代謝和蛋白质代謝具有共同的交叉点，通过交叉点三类物质可以相互转变。

动物、植物和微生物的营养方式不同，它們具有不同的代謝类型。植物以及一部分微生物能利用无机物来綜合有机物。动物以及大部分微生物則必須自环境中获得有机物。虽然如此，它們在糖、脂肪和蛋白质的代謝过程中，有許多地方是相似的。例如，在許多生物机体內，糖的无氧分解几乎都按照完全相同的过程进行。

本章将就組織中的糖、脂肪和蛋白质的某些中間代謝过程，进行实验。

实验四十七 組織的自溶

在动物机体內，組織蛋白酶参予蛋白质的新陳代謝。組織蛋白酶在微酸性环境（ $\text{pH}=4-5$ ）中作用最强。动物組織的自然环境接近中性，所以組織蛋白酶的作用不很明显。当組織脱离机体后，由于酸类物质的积聚而变为酸性，組織蛋白酶开始活动，結果組織蛋白质被分解，产生組織自溶现象。

組織蛋白质在自溶过程中分解成氨基酸，氨基酸量的增加可用 Folin 氏試剂檢驗。

器材 (1)表面玻璃; (2)50 毫升锥形瓶; (3)2 毫升和 5 毫升吸量管; (4)漏斗; (5)试管及试管架; (6)剪刀和镊子; (7)天平; (8)恒温水浴锅。

试剂 (1)醋酸盐缓冲溶液 (pH=4.0)^[48]; (2)15% 三氯醋酸溶液; (3)0.5N NaOH 溶液; (4)Folin 氏试剂^[36]。

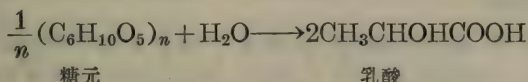
操作 将大鼠或家兔击头杀死, 迅速取出肝脏, 并在低温下用剪刀剪成碎糜。称取组织糜两份, 每份 0.5 克, 分别放入两个盛有 5 毫升醋酸缓冲液的 50 毫升锥形瓶中。向第 1 号锥形瓶中立即加入 2 毫升 15% 三氯醋酸以破坏酶活性 (对照)。混合均匀后, 将两锥形瓶置于 37°C 恒温水浴中, 保温 3 小时后取出。向第 2 号锥形瓶中加入 2 毫升 15% 三氯醋酸, 并摇匀。15 分钟后, 将两样品过滤, 把漏液分别滤入两试管内。

取 2 毫升滤液, 加 7 毫升 0.5N NaOH 溶液和 1 毫升 Folin 氏试剂。混匀后, 静置 5 分钟。比较两个样品颜色的深浅, 来估计组织自溶的程度。

实验四十八 糖元酵解作用⁽¹⁾

糖元在组织内进行无氧分解而生成乳酸的变化, 称为糖元酵解作用。糖元酵解作用中间的变化过程颇为复杂。肌肉组织中的糖元首先与磷酸化合而分解, 经过己糖磷酸酯、丙糖磷酸酯及丙酮酸等一系列中间产物, 最后生成乳酸。

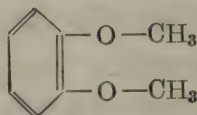
糖元酵解作用可综合成下列反应:



糖元酵解作用是糖供给组织能量的一种代谢过程。在有氧条件下, 组织内糖元酵解作用即受抑止, 而有氧氧化则为代谢的主要途径。糖元可用淀粉代替。

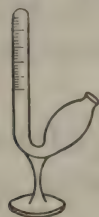
用不含完整細胞的肌肉提取液(即不能呼吸),可以在有氧条件下,进行酵解作用的实验。

糖元或淀粉酵解作用可由乳酸的生成来观测,也可由乳酸与碳酸氢钠作用生成的 CO_2 在发酵管臂管中的积累而观测。乳酸与浓硫酸共热则变成乙醛,后者与白藜芦素发生反应,呈现红色。



白藜芦素

器材 (1)发酵管(图); (2) 1 毫升、2 毫升和 10 毫升吸量管; (3) 试管及试管架; (4)漏斗; (5)10 毫升量筒; (6)天平; (7)恒温箱。



试剂 (1)新鲜肌肉提取液^[49]; (2)0.4M 碳酸氢钠溶液; (3)4% 淀粉溶液; (4)甲苯; (5)氢氧化钙; (6)饱和硫酸铜溶液; (7)浓硫酸;

图 9. 发酵管。 (8)0.125% 白藜芦素(无水酒精溶液)。

操作 取 2 支发酵管,各加新鲜肌肉提取液 8 毫升。另取 1 支发酵管,加煮沸过的肌肉提取液 8 毫升。向第 1 发酵管中,加 2 毫升蒸馏水(对照);向第 2 和第 3 发酵管中各加 2 毫升碳酸氢钠溶液和 6—8 滴甲苯。混匀(为便于混匀,以上操作可在 3 支试管内进行。混匀后,再倒入 3 支发酵管中)。倾斜发酵管,使液体充满臂管,切勿使臂管内含有气泡。以棉花小球堵塞管口,放入 37°C 恒温箱中保温。

24 小时后,取出发酵管,注意各管臂管中是否有气体,比较并解释产气量^①。

① 在煮沸过的肌肉提取液中,酵解酶体系已被破坏。发酵管内不应有乳酸产生,臂管中也不应有显著量的二氧化碳积累。在实验中,如果发现相反现象,改用未经微生物污染的新鲜肌肉提取液,重作实验。

用白藜蘆素反應可檢定乳酸⁽²⁾。與濃硫酸小心地共熱時，乳酸轉變成乙醛。乙醛與白藜蘆素發生反應，生成紅色的縮合物。糖、丙酮酸和甲醛也發生類似的反應⁽³⁾。為了檢定乳酸，必須除去溶液中的糖和蛋白質。為此，取各發酵管的濾液 5 毫升，分別放入 3 支試管。向各試管內加硫酸銅溶液 1 毫升，混勻；再加氫氧化鈣粉末 0.5 克，用力振蕩。因皮膚上有乳酸，振蕩時，勿使手指接觸液體。放置 30 分鐘，並不時振蕩，使糖沉淀完全。過濾，除去沉淀。取上述三種濾液各 0.5 毫升，分別加入另外 3 支試管中。將試管置冰水中，用量筒量取濃硫酸 1.5 毫升，徐徐加入，同時不斷地振蕩試管。此時，溶液應無色透明。如果濃硫酸加得太快，溶液溫度急劇上升，由乳酸生成的乙醛或被氧化成乙酸，或揮發，結果一部分乳酸損失。將加完濃硫酸的 3 支試管，一起放入沸水浴中煮 4 分鐘（準確！）。取出後，立刻浸入冰水中冷卻。各加白藜蘆素溶液 4—5 滴。混勻。於室溫下靜置 20 分鐘後，比較和記錄各管溶液的顏色（見 106 頁的注），並解釋結果。

實驗四十九 發酵過程中無機磷的利用

酵母能將蔗糖和葡萄糖發酵成為乙醇及二氧化碳。發酵作用和酵解作用的基質和最終產物雖然不同，但其中間化學步驟則幾乎完全一樣。在發酵過程中，葡萄糖首先經過磷酸化，生成己糖磷酸酯、丙糖磷酸酯及其他磷酸酯等中間產物。

葡萄糖的磷酸化反應，可以由反應混合物中無機磷的消失來觀測。磷酸與鉬酸相作用生成鉬磷酸的絡合物，後者能被 α -1, 2, 4 氨基萘酚磺酸鈉還原成鉬藍。據此，可測定無機磷。

器材 (1) 乳鉢及杵；(2) 試管及試管架；(3) 1 毫升和 5 毫升吸量管；(4) 漏斗；(5) 10 毫升刻度離心管；(6) 100 毫升容量瓶；(7) 恆溫水浴鍋。

試劑 (1)磷酸鹽溶液^[69]; (2)新鮮啤酒酵母; (3)蔗糖; (4)5%三氯醋酸溶液; (5)5*N* 硫酸和 2.5%鉬酸鉍等體積混合液; (6) α -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸鈉溶液^[30]。

操作 稱取約 2 克酵母，置于乳鉢內。加 1 克蔗糖、5 毫升水和 5 毫升磷酸鹽溶液，仔細磨勻。用吸量管取出 1 毫升均勻的懸浮液，置于試管中(試樣 1)。加 3 毫升三氯醋酸。搖勻。把剩余的懸浮液移入另一試管，並在 37°C 恆溫水浴中保溫。每隔 30 分鐘取出 1 毫升懸浮液，共取 3 次(試樣 2、3 和 4)。

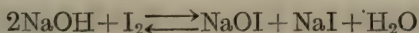
吸取懸浮液以前，注意用力搖勻試管中混合物。取出後，立即加入 3 毫升三氯醋酸溶液。將 4 個試樣分別過濾，取濾液各 1 毫升，置于 100 毫升容量瓶內，用水稀釋至刻度。取出稀釋液 1 毫升，移入 10 毫升刻度離心管內。加 2.5 毫升鉬酸鉍溶液和 0.5 毫升 α -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸鈉溶液。混勻後，靜置 15 分鐘。比較各管藍色的深淺。可以看出，隨著發酵過程的進行，反應混合物中無機磷含量逐漸減少。

實驗五十 脂肪酸的氧化⁽⁴⁾

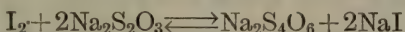
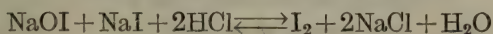
根據 β -氧化學說，機體組織能使脂肪酸氧化生成乙酰輔酶 A。兩分子乙酰輔酶 A 可縮合成乙酰乙酸。在肝臟內，乙酰乙酸可脫羧生成丙酮，也可還原生成 β -羥丁酸。乙酰乙酸、 β -羥丁酸和丙酮總稱為酮體。酮體為機體代謝的中間產物。在正常情況下，其產量甚微；患糖尿病或食用高脂肪膳食時，血中酮體含量增加，尿中也能出現酮體。

本實驗用新鮮肝糜^①與丁酸保溫，生成的丙酮可用碘仿反應來測定^(5,6)。在鹼性條件下，丙酮與碘生成碘仿。反應式如下：

① 肝糜必須新鮮。放置久的肝臟，喪失氧化脂肪酸的能力。



剩余的碘,可用标准硫代硫酸钠滴定。



根据滴定样品与滴定对照所消耗的硫代硫酸钠之差,可计算由丁酸氧化生成的丙酮量。

器材 (1)玻璃皿;(2)50毫升锥形瓶;(3)试管及试管架;(4)2毫升和5毫升吸量管;(5)漏斗;(6)5毫升微量滴定管;(7)剪刀和镊子;(8)天平;(9)恒温水浴锅。

试剂 (1)Locke氏溶液^[50];(2) $\frac{1}{15}M$ 磷酸缓冲液(pH=7.6);(3)0.5N丁酸溶液^[51];(4)15%三氯醋酸溶液;(5)10%氢氧化钠溶液;(6)10%盐酸;(7)0.1N碘溶液^[52];(8)0.1N硫代硫酸钠溶液^[16];(9)0.1%淀粉溶液。

操作 用重物击毙动物(家兔、大鼠或豚鼠),并迅速把血放尽。取出肝脏,在玻璃皿上剪成碎糜。

取50毫升锥形瓶两个,各加3毫升Locke氏溶液和2毫升pH=7.6磷酸缓冲液。在一锥形瓶内,加3毫升0.5N丁酸溶液,另一锥形瓶作对照。取约0.5克肝组织两份(要等重),分别置于两锥形瓶内。混匀。在37°C恒温水浴内保温。

保温2小时后,取出锥形瓶,各加入2毫升三氯醋酸。在对照瓶中加入3毫升0.5N丁酸。混匀。静置15分钟后,过滤。另取两锥形瓶,分别量入5毫升滤液、5毫升0.1N碘溶液和5毫升10%氢氧化钠溶液。摇匀后,静置10分钟。加入5毫升10%盐酸,用0.1N硫代硫酸钠溶液滴定剩余碘。滴至浅黄色时,加入3滴淀粉溶液作指示剂。摇匀并继续滴到蓝色消失。记录滴定样品

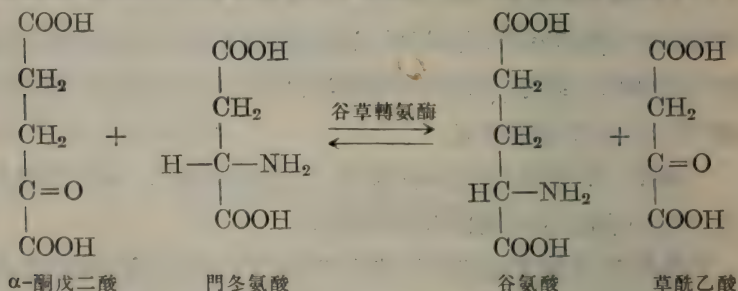
与对照所用硫代硫酸鈉的毫升数,并計算样品中丙酮含量^①。

实验五十一 氨基移換反应(一)

谷丙氨基移換酶活性的測定^②

(光电比色法)⁽⁷⁾

氨基移換酶也称轉氨酶,为广泛存在于生物机体內的酶。其作用为催化 α -氨基酸的 α -氨基与 α -酮酸的 α -酮基互換。因此,在氨基酸的合成和分解,尿素和嘌呤的合成等中間代謝过程中有重要作用。轉氨酶的种类甚多,任何一种氨基酸进行轉氨作用时,都由其专一的轉氨酶催化。它們的最适 pH 接近 7.4。在各种轉氨酶中,谷氨酸-草酰乙酸轉氨酶(简称谷草轉氨酶)及谷氨酸-丙酮酸轉氨酶(简称谷丙轉氨酶)活力最强。它們催化的反应如下:



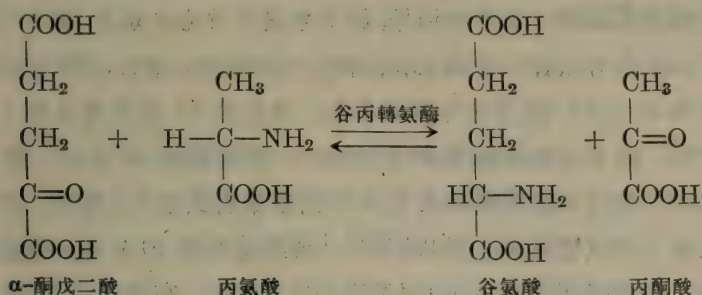
① 先求与 1 毫升 0.1N 硫代硫酸鈉相当的丙酮量。再由样品和对照消耗硫代硫酸鈉之差,計算样品滤液中的丙酮含量。

② 本測定方法亦可用于谷草轉氨酶活性測定。但需注意以下三点:

1. 轉氨酶底物不是 α -酮戊二酸和丙酮酸,而是 α -酮戊二酸和門冬氨酸,其配制方法是取分析純 α -酮戊二酸 29.2 毫克,DL-門冬氨酸 2.66 克,置于小燒杯內,加 1N NaOH 使完全溶解。用 1N NaOH 或 1N HCl 調 pH 至 7.4 后,再加磷酸緩冲液至 100 毫升,最后加氯仿数滴防腐。此溶液每 1.0 毫升含 α -酮戊二酸 2.0 微克分子(μm),門冬氨酸 200 微克分子。在冰箱內可保存一周。

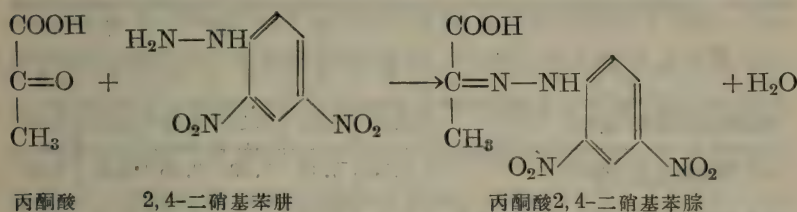
2. 由于谷草轉氨酶在反应結束生成的草酰乙酸容易自行轉变成丙酮酸。丙酮酸的生成量与草酰乙酸的量有一定平衡关系。因此,也可用測定丙酮酸法,計算谷草轉氨酶活性。

3. 谷草轉氨酶活力的測定受 pH、温度、保温时间长短、样品新鮮程度、溶血等因素影响。



上述两种转氨酶均广泛存在于机体组织内，在正常人血清中也有少量。机体发生肝炎、心肌栓死等病变时，血清中转氨酶活力常显著增加，所以在临床诊断上转氨酶活力的测定有重要意义。

测定转氨酶活力的方法很多，如分光光度法、纸上层析法及光电比色法等。普遍采用的是光电比色法。在本方法中，谷丙转氨酶作用于丙氨酸和 α -酮戊二酸后，生成的丙酮酸与2,4-二硝基苯肼作用生成丙酮酸2,4-二硝基苯腙。



丙酮酸2,4-二硝基苯腙加碱处理后呈棕色。从丙酮酸2,4-二硝基苯腙的生成量，可以计算酶的活力。

器材 (1) 试管; (2) 吸量管; (3) 恒温水浴锅; (4) 光电比色计。

试剂 (1) 0.1M 磷酸缓冲液(pH7.4); (2) 丙酮酸钠标准溶液(2.0 微克分子/毫升)^[53]①; (3) 谷丙转氨酶底物^[54]; (4) 2,4-二硝基苯肼溶液^[55]; (5) 0.4N 氢氧化钠。

① 如发现丙酮酸钠标准液混浊(可能是细菌污染),则须重新配制。

操作 取两支試管并标号,第1号試管做为未知管,第2号試管做为空白对照管。各加入谷丙轉氨酶底物0.5毫升,置于37°C水浴內10分钟,使管內外溫度平衡。取血清0.1毫升加入第1号試管內,两支試管再放入37°C水浴中,繼續保溫60分钟。整60分钟时,向两支試管內加入2,4-二硝基苯肼試剂0.5毫升,然后再向第2号試管內加血清0.1毫升,再繼續保溫20分钟。保溫終了时,向兩試管中各加入0.4N NaOH 5毫升。在室溫下靜置30分钟后,用520毫微米濾光片进行比色測定未知管的光密度(在显色后30分钟至2小时內其色度稳定)。用光密度讀数在标准曲綫上查出轉氨酶活力的单位数。計算每100毫升血清中轉氨酶的活力单位数^①。

标准曲綫的繪制:

取6支試管,分別用0、1、2、3、4、5标号。按下表所列的次序添加各試剂:

試 剂	試 管 号					
	0	1	2	3	4	5
丙酮酸鈉标准液(毫升)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
谷丙轉氨酶底物*(毫升)	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25
磷酸緩冲溶液(0.1M, pH7.4)(毫升)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

* 在呈色反应中,2,4-二硝基苯肼可与有酮基的化合物作用形成苯腙。底物中的 α -酮戊二酸可与之发生反应,生成 α -酮戊二酸苯腙。因此,在做标准曲綫时,須加入一定量的底物(內含 α -酮戊二酸)以抵銷由 α -酮戊二酸产生的消光影响。

將試管置于37°C水浴中保溫,平衡管內外溫度。向各管內加0.5毫升2,4-二硝基苯肼后再保溫20分钟,最后,分別向各管內加入0.4N NaOH 5毫升。在室溫下靜置30分钟后,以0号管做空

① 在本实验条件下,每1微克分子丙酮酸代表1.0单位酶活力。

白,用 520 毫微米滤光片进行比色,讀出光密度。以丙酮酸的微克分子数为横坐标,光密度为纵坐标,画出标准曲线。

实验五十二 氨基移换反应(二)

谷丙氨基移换酶活性的测定

(紙上层析法)

在前一实验中已提到,轉氨酶活性测定除光电比色法、分光光度法等以外,还有紙上层析法。

用紙(常用滤紙)作为惰性支持物的层析法叫做紙上层析法。此法已发展成为生物化学研究和生产实际中的一项重要而簡便的分析方法^(8,9)。

层析溶剂是由有机溶剂和水組成,当有机溶剂和水部分互溶时,即分成二相:一相是以水飽和的有机溶剂相,一相是为有机溶剂飽和的水相。滤紙纖維和水有着較强的亲和力,而与有机溶剂則亲和力較弱,因此滤紙可以看作是含有靜止水相的惰性支持物。水相因此称为靜止相,有机相称流动相。当有机相沿紙流动經過层析点时,层析点上溶质便在水相和有机相之間进行分配,有一部分溶质离开原点随有机相移动,而进入无溶质的区域,这时又重新进行分配,一部分溶质从有机相移入水相。当有机相不断流动时,溶质也就不断进行分配,沿着有机相流动方向移动。溶质中各种不同組份的移动速率不同时,就可以彼此分开。溶质在紙上移动的速率可以用 R_f 值表示(图 10):

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}} = \frac{A}{B}$$

不同物质在一定条件下,有其特异的 R_f 值。 R_f 值的大小与物质的化学性质,溶剂系

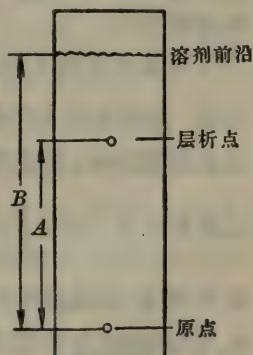


图 10. 层析紙条。

統, 层析滤紙的质地, 层析溫度等因素有关。

本实验利用滤紙层析法检查由谷氨酸和丙酮酸在谷丙轉氨酶的作用下所生成的丙氨酸来证明轉氨作用。

器材 (1)50 毫升錐形瓶; (2)1 毫升和 2 毫升吸量管; (3)漏斗; (4)試管及試管架; (5)剪刀和镊子; (6)恒溫水浴鍋; (7)干的大試管(直徑 20 毫米, 长 200 毫米); (8)毛細管; (9)层析滤紙(寬 15 毫米, 长 150 毫米); (10)烘箱; (11)噴霧器。

試剂 (1)谷氨酸溶液^[56]; (2)丙酮酸鈉溶液(11 毫克/毫升); (3)0.1% 碳酸氫鉀溶液; (4)15% 三氯醋酸; (5) $\frac{1}{500}M$ 一溴醋酸溶液; (6)酚溶剂^[57]; (7)0.1% 茚三酮酒精溶液; (8)标准丙氨酸溶液(0.04%)。

操作 取 4 个标有號碼的錐形瓶。在第 1 号和第 4 号两瓶中加入谷氨酸溶液、丙酮酸鈉溶液各 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 2 毫升, 在第 2 号瓶中加入丙酮酸鈉溶液 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 3 毫升, 在第 3 号瓶中加入谷氨酸溶液 1 毫升和 0.1% 碳酸氫鉀溶液 3 毫升。最后在 4 个錐形瓶中各加入 0.5 毫升 $\frac{1}{500}M$ 一溴醋酸溶液。

将剛杀死的大鼠或兔的肌肉在低溫下研碎。称取 4 份, 每份各 1 克, 分別放入 4 个錐形瓶中并向第 4 号瓶立即加入 2 毫升 15% 三氯醋酸溶液。将各瓶內容物搖匀后, 置于 37°C 恒溫水浴中保溫, 并經常搖动。在 $1\frac{1}{2}$ —2 小时后取出并向第 1、2、3 号瓶中各加入 2 毫升 15% 三氯醋酸溶液。混匀。放置 15 分钟以沉淀蛋白质。过滤, 把滤液滤入試管中。用塞塞紧, 放置于低溫处备用。样品可按下列两种方法进行层析:

(I)取滤纸条(宽 15 毫米,长 160 毫米)4 条,分别在其一端用铅笔标上第 1—4 号。不要用手直接接触纸条。

在其另一端距边缘 1 厘米处,用铅笔轻画一条与纸边平行的底线,用 4 根毛细管取以上 4 个管中的滤液分别对号点在滤纸条底线的中心上,毛细管口轻轻触到纸面上使滤液分别成直径为 2—3 毫米的圆斑(图 11)。为使有足够量的样品点在滤纸上,每一样品应重复点 3—4 次,每次点样后,待凉干(或用吹风机吹干)再点下一次。

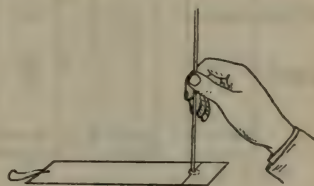


图 11. 点样。

在准备好的干大试管中,加入 2 毫升酚溶剂,不要让溶剂沾在试管壁上(注意酚会烧伤皮肤),并将管直立在架子上。在已点好样的滤纸条上端打一孔,并用线挂在大试管塞的钩子上。随后,将滤纸条移入大试管中,不要使滤纸浸入酚溶剂。盖上塞。过 30 分钟,再

将滤纸条降低,使浸入酚溶剂 2—3 毫米(图 12)。注意不要使滤纸条贴在试管壁上。将塞盖严。待酚溶剂走到离滤纸条上端 2 厘米处时(约需 $1\frac{1}{2}$ —2 小时),取出滤纸,在 100°C

烘箱中烘 10—15 分钟,以除去酚溶剂。用喷雾器向滤纸喷 0.1% 茚三酮酒精溶液,喷湿后,放入 60°C 烘箱中 10—15 分钟。氨基酸与茚三酮进行反应,在滤纸上呈现紫红色斑点。与标准样品(标准谷氨酸和丙氨酸,层析操作同样品)比较,确定各点是什么氨



图 12. 试管层析装置。氨基酸。

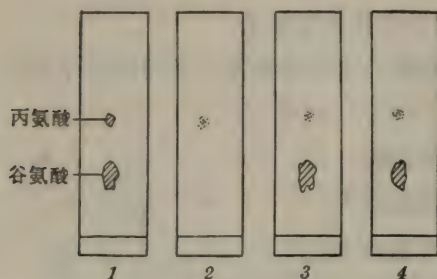


图 13. 层析结果示范。

实验结果如图 13。1 号加有完全的反应体系，2 号缺谷氨酸，3 号缺丙酮酸，4 号酶已被 15% 三氯醋酸破坏。因此，只有一号滤纸条上出现谷氨酸和丙氨酸层析点。但由于肌肉中有少量游离氨基酸特别是丙氨酸，有时在 2、

3、4 号中能看到丙氨酸痕迹斑点，比 1 号要淡得多。

(II) 如条件允许，最好用层析罩在层析室内层析，其方法如下。

两人合用滤纸一张(宽 15 厘米，长 20 厘米)，在其一端距边缘 1.5 厘米处用铅笔轻画一条与纸边平行的底线。在纸上每隔 2 厘米处用铅笔点一小点，共 9 点，点外画一半径为 1.5 毫米的小圆圈(图 14)，依上法将样品(每人 4 点)和标准丙氨酸(1 点)点在层析纸上。点完后，将滤纸卷成圆筒，并用线将两端缝合，如图 15。缝时，需注意在两纸端间留一宽缝，以免接触产生毛细现象。缝好后放入层析罩内，如图 16。用被酚所饱和的水(平衡溶剂)平衡 20 分钟(在制备酚溶剂时，分液漏斗的上层溶液即为被酚所饱和的水溶液)。平衡后，从

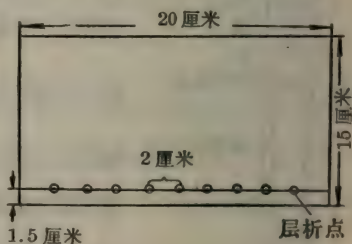


图 14. 层析滤纸及尺寸点样位置。

上口，用带小漏斗的玻璃管加入酚溶剂 25 毫升于层析缸内。加完后，立即盖紧塞子。当溶剂前沿行至距纸端约 2 厘米处时，取出凉干，按前面所述方法显色。

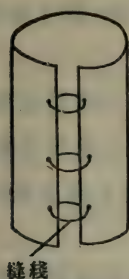


图 15. 卷成圓圈的层析滤紙。

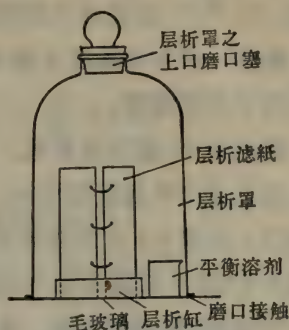
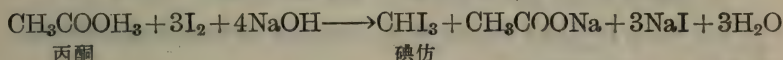


图 16. 钟罩层析装置。

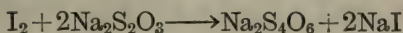
实验五十三 氨基酸的生酮作用

氨基酸在組織內的中間代謝过程中，可轉变成糖和脂肪类中間代謝产物。有些氨基酸是“生糖”的，能轉变成葡萄糖或糖元；有些是“生酮”的，能轉变成酮体。酪氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸均为生酮氨基酸。

将生酮氨基酸与肝組織混合保温，即可观察到酮体的生成。酮体中之丙酮在鹼性环境中，能与碘作用生成碘仿。



如果向样品中加入一定量的碘，与丙酮作用后，剩余的碘可用硫代硫酸鈉来滴定。



器材 (1)玻璃皿；(2) 50 毫升錐形瓶；(3) 2 毫升和 5 毫升吸量管；(4)漏斗；(5)試管及試管架；(6)5 毫升微量滴定管；(7)剪刀和镊子；(8)天平；(9)恒溫水浴鍋。

試剂 (1)生理盐溶液^[70]；(2)0.1M 亮氨酸溶液；(3)15% 三氯醋酸溶液；(4)10% 氫氧化鈉溶液；(5)0.1N 碘溶液^[52]；(6)10%

盐酸; (7) 0.1N 标准硫代硫酸鈉溶液^[16]; (8) 0.1% 淀粉溶液。

操作 击头杀死家兔或大鼠。立即取出肝臟, 置于玻璃皿中, 在低溫下剪成碎糜。

取两个 50 毫升錐形瓶。在一錐形瓶內, 加 3 毫升生理盐溶液和 3 毫升 0.1M 亮氨酸溶液, 另一錐形瓶內加 6 毫升生理盐溶液 (对照)。称取 0.5 克肝組織糜两份, 分別放入两个錐形瓶內。將錐形瓶置于 37°C 恒溫水浴內保溫 2 小时。

保溫后, 取出錐形瓶, 各加 15% 三氯醋酸溶液 2 毫升, 混勻后, 靜置 15 分钟。过滤, 將滤液濾入試管內。另取两个錐形瓶, 分別加入 5 毫升滤液, 5 毫升 0.1N 碘溶液和 5 毫升 10% 氫氧化鈉溶液, 并搖勻。靜置 10 分钟后, 加入 5 毫升 10% 盐酸和几滴 0.1% 淀粉溶液, 用 0.1N 硫代硫酸鈉溶液来滴定剩余碘。計算样品中丙酮含量。

参考书目

- (1) Збарский, Б. И., Збарский, И. Б., Солцев, А. И., Практикум по биологической химии, стр. 153 (1954).
- (2) Baker, S. B., Am. J. Physiol., **129**, 305 (1940).
- (3) Koch, F. C. and Hanke, M. E., Practical Methods in Biochemistry, 6th Ed., p. 215 (1953).
- (4) Jowett, M. and Quastel, J. H., Biochem. J., **29**, 2143 (1935).
- (5) Quastel, J. H. and Wheatley, A. H. M., Biochem. J., **27**, 1753 (1933).
- (6) Фердман, Д. Л. и Сопин, Е. Ф., Практикум по биологической химии, стр. 97 (1957).
- (7) 临床檢驗杂志, 第 3 期, 总 135—140 頁, 1960 年.
- (8) 潘家秀等, 蛋白质化学研究技术, 34 頁 (1962).
- (9) Consden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. J. P., Biochem. J., **38**, 224 (1944).

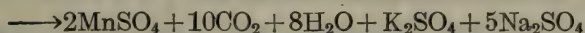
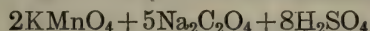
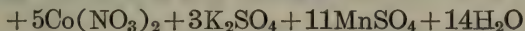
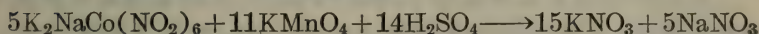
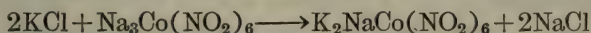
第七章 血液定量分析

实验五十四 血清钾的测定

(Clausen, Kramer 和 Tisdall 滴定法)⁽¹⁾

常人血清中每 100 毫升, 约含钾 16—22 毫克, 变动范围不大。患肺炎及急性传染病时, 其量稍减。血球中之钾含量较高, 每 100 毫升全血约含 150—250 毫克。因此, 制取样品时, 应避免溶血, 血清也必须迅速从凝块中分出, 否则, 可能有一部分钾从血球渗入血清。血取出后, 应在 1—2 小时内将血清分出。

血中的钾与亚硝酸钴钠发生反应, 生成黄色的亚硝酸钴钠钾沉淀。用标准高锰酸钾溶液使此沉淀氧化分解。剩余的高锰酸钾用过量的标准草酸钠溶液还原。剩余的草酸钠再用标准高锰酸钾反滴定。这样, 可以算出样品中钾的含量。1 毫升 0.02N 高锰酸钾可以氧化分解含有 0.142 毫克钾的亚硝酸钴钠钾^①。



器材 (1)1毫升、2毫升和 5 毫升吸量管; (2)15 毫升刻度离心管; (3)50 毫升锥形瓶; (4)水浴锅; (5)微量滴定管; (6)离心机。

试剂 (1)亚硝酸钴钠溶液^[58]; (2)0.02N 草酸钠溶液^[59]; (3)

① Hoffmann 和 Jacobs⁽²⁾对此法作了改进。在亚硝酸钴钠钾沉淀中先加入盐酸固醇, 再加亚铁氰化钾, 产生绿色。用适当标准进行比色测定。

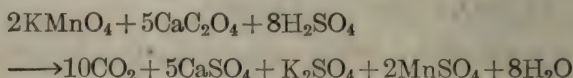
0.02N 高锰酸钾溶液^[60]; (4) 1:2 亚硝酸钠溶液^[61]。

操作 用吸量管将 1 毫升血清, 量入 15 毫升刻度离心管。加 1:2 亚硝酸钠溶液 0.5 毫升, 摇匀。静置 5 分钟, 加水稀释至 4 毫升, 再摇匀。然后慢慢加入亚硝酸钴钠试剂 2 毫升, 静置 30 分钟。置离心机中, 以每分钟 1,500 转速离心 5 分钟。除去上层清液至 0.3 毫升刻度, 加水 5 毫升洗涤, 勿摇动沉淀。再置离心机中离心 3 分钟, 除去洗液。如上洗三次至上层清液无色后, 加 2 毫升 0.02N KMnO_4 及 1 毫升 4N H_2SO_4 。用玻棒搅匀, 置沸水中加热约 1 分钟, 应得红色澄清溶液。加 0.2N $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 溶液 2 毫升, 还原过量的 KMnO_4 。过量的 $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 以 0.02N KMnO_4 滴定。轻微的粉红色为滴定终点。计算每 100 毫升血清中钾的含量。

实验五十五 血清钙的测定

常人血清每 100 毫升约含钙 9—11 毫克, 儿童血清钙稍高。手足搐搦症或软骨病患者, 血中钙量减低, 常在 7 毫克% 以下。割除甲状腺后, 动物血中之钙量顿减; 反之, 如注射甲状腺提取液, 其钙量即增高。

血钙绝大部分存在血清中, 血球中很少, 所以血钙的定量测定常用血清^①。先用草酸铵将血清钙变成草酸钙沉淀。沉淀溶于硫酸后, 用标准高锰酸钾溶液滴定^(3,4)。



器材 (1) 1 毫升、2 毫升及 5 毫升吸量管; (2) 15 毫升刻度离心管; (3) 50 毫升锥形瓶; (4) 水浴锅; (5) 微量滴定管; (6) 离心机。

① 防止溶血, 因为钙在血球和血清之间的分布很不均匀。

试剂 (1) 0.01N 高锰酸钾溶液(1 毫升=0.2 毫克钙)^[60](高锰酸钾溶液不很稳定, 每经数日须标定一次); (2) 4% 草酸铵溶液; (3) 稀氨水(以水稀释 2 毫升浓氨至 100 毫升); (4) 1N 硫酸。

操作 用吸量管将血清 1 毫升移入 15 毫升离心管中, 加蒸馏水 3 毫升和 4% 草酸铵 1 毫升。充分摇匀, 静置 30 分钟后, 再摇匀。离心使草酸钙沉于管底。小心取出离心管(勿使沉淀振起), 小心迅速倾出上清液后, 将离心管倒置滤纸上。稍停, 用滤纸将管口擦干, 再以稀氨水 3 毫升, 沿管壁冲洗。轻敲管底, 使大部分沉淀被摇起。再离心 5 分钟, 用前法除去上清液。小心用吸量管吸 1N 硫酸 2 毫升, 吹入管内, 使沉淀被击起而易于溶解, 将离心管置于沸水浴中约 1 分钟^①, 趁热以 0.01N 高锰酸钾溶液滴定, 至淡红色时经 1 分钟不褪, 即为终点。

取 1 毫升蒸馏水代替血清作对照实验。

实验五十六 血中无机磷的测定

常人血液中每 100 毫升含无机磷约 3.5 毫克, 婴儿及孩童约含 5 毫克。患佝偻病者可降至 2 毫克。

无机磷在血浆及血球中的浓度约略相等, 磷酸酯则绝大部分在血球中。血浆中有磷酸酶, 当血液放置时, 一部分磷酸酯即被磷酸酶催化水解, 因而无机磷酸盐的量增高。此种变化, 在有溶血现象时更显著, 所以测定无机磷或磷酸酯, 须用新鲜样品。血液抽出后, 不可超过 1—2 小时, 并要预防溶血^②。

用三氯醋酸沉淀血中蛋白质, 制备无蛋白血滤液。无机磷酸盐则溶存于滤液中。无机磷可与钼酸铵发生反应, 生成磷钼酸铵。

① 最好保持在 70—75°C。温度过低反应速度慢, 过高则草酸钙可能分解。

② 为了避免溶血, 最好用血清进行测定, 并在取血后立即测定。

用硫酸亚铁^①或其他还原剂还原磷钼酸铵,使成钼蓝,钼蓝大致成分为 $(\text{MoO}_2\cdot 4\text{MoO}_3)_2\cdot \text{H}_3\text{PO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。蓝色相当稳定,在适当条件下,可用比色法测量其深浅度。在一定范围内,颜色的深度和样品中磷含量成正比关系。

器材 (1) 0.5 毫升、1 毫升、2 毫升及 5 毫升吸量管; (2) 50 毫升锥形瓶; (3) 试管; (4) 光电比色计(或目视比色计)。

试剂^② (1) 20% 三氯醋酸; (2) 5% FeSO_4 ; (3) 钼酸铵溶液^[62]; (4) 标准磷酸溶液(每毫升含 0.01 毫克磷)^[63]。

操作 用 1 毫升吸量管将 1 毫升全血^③(或血清),量入 50 毫升锥形瓶。加水 6 毫升和 20% 三氯醋酸 3 毫升(如为全血,加水后立即加三氯醋酸)。用力混匀,并放置 5 分钟后,用不含磷酸盐的优质滤纸过滤。血滤液应清亮无色。保存滤液备用。

取试管 2 支,按下表配制:

加 入 项 目	未 知 管	对 照 管
1. 血滤液	5 毫升	—
2. 标准磷酸盐溶液	—	2 毫升
3. H_2O	2.5 毫升	4 毫升
4. 20% 三氯醋酸溶液	—	1.5 毫升
5. 钼酸铵试剂	0.5 毫升	0.5 毫升
6. 5% FeSO_4	2 毫升	2 毫升

将以上二管分别混匀,放置 10 分钟后用光电比色计(或目视比色计)比色^④。计算每 100 毫升全血中的磷含量。

^① Kuttmer 和 Lichtenstein⁽⁵⁾用氯化亚锡作为还原剂,使灵敏度增加。可用更少的样品进行分析。但没有 Fiske 和 Subbarow 法⁽⁶⁾准确度大。

^② 所用试剂必须纯净,不含磷酸根。

^③ 如使用加草酸钾作抗凝剂,草酸钾不能过多,否则不易显色。每毫升样品内草酸钾含量不多于 2—3 毫克。

^④ 如用光电比色计比色,可先用标准磷酸溶液制出磷量-光密度曲线(用 660 毫微米滤光板)。

实验五十七 血中胆固醇的测定

人血液每 100 毫升约含胆固醇 100—230 毫克。患慢性或急性肾炎及糖尿症者，其血液之胆固醇常有增加。患急性贫血症则降低。膳食中脂肪高时，血中胆固醇含量亦高，反之则低。

血液或血浆烘干后，以氯仿浸提胆固醇^①。胆固醇与醋酸酐、浓硫酸作用后，呈绿色（反应机制请参看“类脂的分离与鉴定”实验）。用比色计进行比色。此色彩渐变黄色，故比色宜迅速。

器材 (1) 0.5 毫升、2 毫升和 10 毫升吸量管；(2) 带有螺旋冷凝器的提取管⁽⁸⁾；(3) 带刻度试管；(4) 光电比色计；(5) 水浴锅。

试剂 (1) 氯仿；(2) 醋酸酐；(3) 浓硫酸；(4) 胆固醇标准液（5 毫升含 0.5 毫克胆固醇。胆固醇 50 毫克溶于 500 毫升氯仿）。

操作 用吸量管取 0.5 毫升血液滴于直径 5—7 厘米的无脂滤纸上。在 70°C 烤箱内烘干后，将纸折迭，悬挂于螺旋冷凝器下，插入管中，管内盛氯仿 8 毫升。置管于 70—80°C 水浴中，热 40 分钟。冷后，加氯仿至 10 毫升，醋酸酐 2 毫升和浓硫酸 0.2 毫升。同时取 5 毫升标准胆固醇溶液，移入另一试管中，加氯仿 5 毫升，醋酸酐 2 毫升和浓硫酸 0.2 毫升。将二管塞紧，摇匀，置暗处约 5 分钟后，以光电比色计（或目视比色计）比色，并计算每 100 毫升血液中胆固醇含量。

参考书目

- (1) Kramer, B. and Tisdall, F. F., J. Biol. Chem., **46**, 339 (1921).
- (2) Hoffmann, W. S. and Jacobs, H. R. D., J. Biol. Chem., **93**, 685 (1931).
- (3) Clark, E. P. and Collip, J. B., J. Biol. Chem., **63**, 461 (1925).

^① 或用酒精-乙醚混合液(3:1)抽提[Sachett⁽⁷⁾]。

-
- (4) Sendroy, J., Jr., J. Biol. Chem., **152**, 539(1944).
 - (5) Kuttner, T. and Lichtenstein, L., J. Biol. Chem., **86**, 671(1930).
 - (6) Fiske, C. H. and Subbarow, Y., J. Biol. Chem., **66**, 375(1925).
 - (7) Sachett, G. E., J. Biol. Chem., **64**, 203(1925).
 - (8) Ling, S. M., J. Biol. Chem., **76**, 361(1928).

第八章 尿的分析

尿的成分与体内物质代谢有密切关系。当代谢不正常时，尿的成分常有改变。因此，尿的分析在临床生化中和在代谢研究中都很重要。

尿中成分，有的在收集后，必须立即分析，有的可稍迟。尿酸及尿素的测定，应于当日进行，因尿酸易于沉淀，尿素可分解生成氨和二氧化碳。另外，肌酐也可变成肌酸。检查尿中是否有糖，应在3小时内进行。系统正规分析，应从24小时尿中取样。

实验五十八 尿酸的测定

24小时正常尿约含尿酸0.5—1.0克。患痛风症者，病发前尿酸排泄低，病发时则增高。白血病患者核蛋白分解较多，尿酸排泄也多。

尿中尿酸与砷磷钨酸作用，产生蓝色。测量颜色的深浅度，即可计算溶液中尿酸含量⁽¹⁾①。

器材 (1) 50毫升容量瓶；(2) 微量滴定管；(3) 1毫升、10毫升吸量管；(4) 光电比色计。

试剂 (1) 砷磷钨酸试剂^[64](毒)；(2) 5% NaCN溶液^[65](极毒)；(3) 标准尿酸溶液^[66](5毫升含有0.1毫克尿酸)。

操作 将尿稀释10倍至20倍(10毫升稀释尿约含尿酸0.15—0.3毫克)。取50毫升容量瓶，加稀释尿10毫升，5% NaCN 5毫升(由滴管放入)，砷磷钨酸试剂(由滴管加入)1毫升。轻轻摇动。

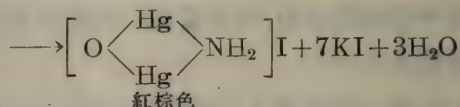
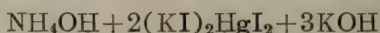
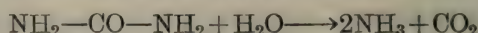
① 因为尿中含有与砷磷钨酸试剂反应产生颜色的其他物质，测得结果一般偏高。

放置 5 分钟后,加水至刻度并混匀。同时取尿酸标准溶液 10 毫升(含有 0.2 毫克尿酸)代替尿样品制备比色标准。用目视比色计或光电比色计比色。计算 24 小时尿中的尿酸含量。

实验五十九 尿素的测定

尿素是哺乳动物、某些鱼类和某些两栖动物蛋白质代谢的重要产物。人每天由尿中约排出 10 克尿素氮,排出量受膳食中蛋白质含量的影响。吃高蛋白膳食后,排泄量高。肾和肝的功能状态对尿素排泄量也有影响。肝功能损害时,尿素形成受阻碍。肾功能损害时,则尿素排泄受阻碍。在以上两种情形下,尿中尿素排出量均减少。

在脲酶作用下尿中的尿素分解为氨和二氧化碳。氨和二氧化碳可结合成碳酸铵。生成的铵盐可以直接用 Nessler 氏试剂比色测定^①。尿中尿素排除量常以尿素氮来表示。



尿中含有铵盐。计算尿中尿素氮时,应从测得的氮量中减去尿中的铵氮。也可在测定尿素氮之前,先用硅酸铝钠离子交换剂(permutit)将尿中原有的铵离子除去。

器材 (1) 100 毫升容量瓶; (2) 100 毫升锥形瓶; (3) 25 毫升、10 毫升、5 毫升、0.5 毫升吸量管; (4) 10 毫升量筒; (5) 小漏斗; (6) 滤纸; (7) 牛角勺; (8) 恒温水浴锅; (9) 比色计。

试剂 (1) 粉状硅酸铝钠(permutit 粉)60 孔筛大小; (2) 缓冲

^① Harwood 用盐酸滴定尿素分解生成的碳酸铵⁽²⁾。

溶液^[67]; (3) 脲酶溶液^[68]; (4) Nessler 氏試剂^[41]; (5) 标准硫酸銨溶液(每毫升含氮 0.5 毫克)。

操作 取尿 10 毫升, 在容量瓶內稀釋至 100 毫升。向干的 100 毫升錐形瓶中, 量入稀釋尿 15 毫升。添加硅酸鋁鈉粉 2 克^①。搖蕩 5 分钟后, 靜置使硅酸鋁鈉粉沉降。通过干滤紙和干漏斗滤入干的錐形瓶內。注意保存已用过的硅酸鋁鈉粉, 以便回收。

将滤液 0.5 毫升、水 5 毫升、脲酶溶液 5 滴和緩冲溶液 3 滴量入 100 毫升容量瓶。另外用 5 毫升标准硫酸銨溶液代替 0.5 毫升尿滤液配制比色标准。脲酶溶液和緩冲溶液等均照加。两瓶同时放在 50°C 恒溫水浴中, 随时搖动。30 分钟后取出, 各加水至約 75 毫升。从量筒中迅速地一次加入 Nessler 氏試剂 10 毫升, 搖匀, 再以水稀釋至 100 毫升。5 分钟后比色。計算 24 小时尿中排除的尿素氮。

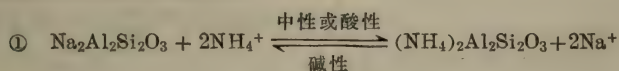
实验六十 尿中病理成分的檢查

正常尿不含蛋白质和糖, 其胆色素和酮体含量也很低。腎臟病患者尿中常有蛋白质。严重糖尿病患者尿中有糖, 酮体含量也增加。肝炎病人和患胆管堵塞病人尿中胆色素含量增多。

器材 (1) 試管; (2) 量筒。

試剂 (1) 濃 NH_4OH ; (2) 濃醋酸; (3) 濃硝酸; (4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末; (5) 亚硝基铁氰化鈉溶液; (6) 蛋白质及糖定性实验中之試剂。

操作 (1) 蛋白质之檢驗: 取 5 毫升尿, 装入試管中, 在尿的上部加热。如有沉淀发生, 可能为凝結蛋白质或磷酸盐类。磷酸



盐类溶于醋酸。加濃醋酸 1—2 滴, 若仍有混浊現象, 即证明有蛋白质。

(2) 糖之檢驗: 应用糖定性反应知識, 檢查尿样品中是否有葡萄糖。

(3) 胆色素之檢驗: 加 3 毫升濃硝酸于試管中, 小心地加上 3 毫升尿, 勿令二液混合。如有胆色素存在, 其接触面显示各色环, 如綠、藍、紫、紅、黃等。

(4) 酮体之檢驗: 置 5 毫升尿于試管中, 加 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 粉末, 使饱和, 再加 3 滴新配制的亚硝基铁氰化鈉溶液 $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6\text{NO}]$ 。將濃 NH_4OH 輕輕加入管内。接触面上如有紅紫色环出現, 即证明有丙酮存在。放置半小时后, 再行观察。如含量甚微, 所需時間較长。

参考书目

- (1) Benedict, S. R. and Franke, E., J. Biol. Chem., **52**, 387(1922).
- (2) Harwood, J. A., Bull. Inst. Med. Lab. Technology, **15**, 41 (1950).

附 录

實驗室規則

1. 实验预习：在每次实验之前，必须对实验内容进行预习。预习应做到了解实验的目的、原理和操作步骤，懂得每一操作步骤的意义和需用的仪器的使用方法。这样，可以避免忙乱和浪费时间，并可保证实验顺利进行及获得正确结果。教员可以在实验开始时，抽查学生对实验的预习情况。只有达到了预习的要求，才准进行实验。

2. 实验报告：实验观察和结果，须随时记录在实验报告纸上。文字要简单准确。报告形式可以使用图表。实验终了时，由班长汇交。

3. 整洁：清洁、整齐，为工作的必要习惯，极应养成。实验台上和橱内务须洁净，放置仪器、药品要有次序。不需要的仪器、药品，不要放在实验台上，以免妨碍操作。勿使试剂药品洒在桌面和地上。实验完毕，须将试剂药品排列整齐，将仪器洗净收起，并将桌面抹拭干净，方得离开实验室。

4. 仪器的洗涤：普通玻璃仪器，如烧瓶、烧杯、试管等，用水和肥皂或去污粉洗刷即可。定量玻璃仪器，如滴定管和吸量管等，必要时可先用铬酸洗液浸泡过夜，再用水冲净，倒置架上，使水自行流出，不能用抹布擦拭里面。肥皂与洗液不能同时使用！滴定管玻塞上如有凡士林，在用铬酸洗液浸泡以前，先将凡士林擦去。若非急用，勿用酒精或乙醚冲洗仪器。

铬酸洗液的配制方法：取重铬酸钾 5 克置于 250 毫升烧杯中，

加水 5 毫升, 搖蕩, 尽量使其溶解。慢慢加入濃硫酸 100 毫升, 随加随搖。冷却后, 儲存于一玻璃广口瓶內, 盖紧盖子以防吸水。

5. 烟雾和臭气处理: 凡发生烟雾, 有毒气体和有臭味气体的实验, 均应在通風橱內进行。橱門应紧閉, 非必要时勿开。

6. 氨气处理: 在生物化学实验中, 常作氨的定量測定。含氨溶液須在另室存放, 以免影响实验結果。

7. 廢物的处理: 廢弃液体可倒入水沟內, 并放水冲走。强酸溶液須先用水稀釋, 然后倒入廢品缸內。滤紙、火柴头、其他固体廢物和带有渣滓沉淀的廢液均应倒入廢品缸內。

8. 本生灯: 燃灯时, 先将火柴划着。一手执火柴近灯口, 一手慢开煤气門。切勿先开气門, 后燃火柴。熄灯时, 关闭气門, 火焰自灭。灯焰大小和火力强弱, 須根据实验需要来調节。用大火焰維持少量开水沸騰, 显然造成浪費。

9. 溫箱和冰箱: 溫箱和冰箱的門必須严密。取放物件时, 应随手关門。在溫箱和冰箱內存放仪器、药品, 必須注明存放人姓名。

10. 珍貴仪器: 天平、比色計、离心机等珍貴仪器, 应重視爱护。使用前, 应熟知使用方法。若有問題, 随时請指导实验人員解答。

11. 实验动物: 进行实验时, 不要戏弄动物。执行杀死解剖等操作, 必須按照規定方法进行。

12. 厉行节约: 使用仪器、药品和动物, 必須注意节约。不要使用过量药品和試剂。不要在滤紙上記数据。使用动物时, 同学間先互相联系, 一个动物的不同部分常可供不同小組使用。因操作不仔細而造成的实验重复, 也是浪費。避免損伤仪器。这样, 不但有利节约, 还可培养实验耐心和訓練技巧。

13. 試剂和标准溶液: 取用后, 須立刻将瓶塞严, 放回原处。量取有毒試剂时, 須用滴定管或量筒, 切勿使用吸量管。自瓶中取出的試剂和标准溶液, 如未用尽, 切勿倒回瓶內, 以免摻混。

14. 碱性溶液的存裝：勿用帶玻璃塞的玻璃瓶存裝氫氧化鈉、氫氧化鉀、氨水和碱性溶液。如必須用帶玻璃的滴定管盛裝碱性試劑，用畢應立即洗去。

15. 火險：勿令酒精、乙醚等易燃液体接近火焰。蒸餾易燃液体要使用水浴，用电炉加热，不可用火焰燒煮水浴。更不可直接用火焰加热。遇有火險，先關閉煤氣門，再用沙土和灭火器灭火。若衣服着火，用水澆或就地一滾。

實驗基本操作和實驗室常識

(一) 攪拌和振蕩

1. 配制溶液时，必須随时攪拌或振蕩混合。配制完了时，必須充分攪拌或振蕩混勻。

2. 攪拌使用的玻璃攪棒必須两头都燒圓滑。

3. 攪棒的粗細長短，必須与盛器的大小和所配制溶液的多少呈适当比例关系。不能用长粗攪棒攪拌小离心管中的少量溶液。

4. 攪拌时，尽量使攪棒沿着器壁运动，不攪入空气，不使溶液飞溅。

5. 傾入液体时，必須沿器壁慢慢傾入，以免有大量空气混入。傾倒表面張力低的液体(如蛋白质溶液)时，更須緩慢仔細。

6. 振蕩溶液时，应沿着圓圈轉动盛器，不应上下振蕩。

7. 振蕩混合小离心管中液体时，可将离心管握在手中，以手腕、肘或肩作軸来旋轉离心管。也可由一手持离心管上端，用另一手彈动离心管。也可用一手大拇指和食指持管的上端，用其余三个手指彈动离心管。手指持管的松紧度要随着振动的幅度变化。还可以把两手掌合攏，夹住离心管，来回搓动。

8. 在量瓶中混合液体时，应倒持量瓶搖动，用手心頂住瓶塞，并不时翻轉量瓶。

9. 在分液漏斗中振荡液体时, 应用一手在适当斜度下倒持漏斗, 用手心顶住瓶塞, 并用另一手控制漏斗活塞。一边振荡, 一边开动活塞, 使任何气体随时由漏斗泄出。

10. 研磨配制胶体溶液时, 要使杵棒沿着乳钵的单方向进行, 不要来回研磨。

(二) 吹制玻璃仪器的基本动作

1. 许多玻璃仪器均由玻璃管吹制而成。吹制时, 左手手背向上, 右手手背向下, 主要由左手转动玻璃管, 右手起支架作用。

2. 必须把玻璃烧软、烧匀后, 再行吹拉。

3. 吹拉玻璃要离开火焰后进行。

4. 吹拉玻璃时, 都要不停地转动, 以抵销重力影响。

5. 弯玻璃管时, 必须随吹随弯。

6. 吹时, 要连续用小口气, 使薄处有先冷却的机会。

(三) 实验室常识

1. 挪动玻璃仪器时, 勿使手指接触仪器内壁。

2. 不要用量瓶作盛器。量瓶是量器。量瓶等带有磨口玻璃塞的仪器的塞子不要盖错。带玻璃塞的仪器和玻璃瓶等, 如果暂不使用, 用纸条把瓶塞和瓶口隔开。

3. 洗净的仪器要放在架上或干净抹布上凉干。不能用抹布擦拭, 特别不能用抹布擦拭仪器内壁。

4. 不用棉花代替橡皮塞或木塞塞堵瓶口或试管口。

5. 不用纸片复盖烧杯和锥形瓶等。

6. 不要用滤纸称量药品, 更不能用滤纸作记录。

7. 不要用石蜡封闭精细药品瓶口, 以免掺混。

8. 使用铅笔在玻璃仪器磨玻璃处写标记。如用蜡笔, 则在亮

玻璃上写。

9. 药瓶换装其他药品时,不能在旧标签上写新药名称,也不能在签上贴签。一定洗去旧标签,换贴新标签。

10. 不能用石膏塗封蒸馏装置。

容量仪器使用法

1. 容量仪器有装量和卸量两种。某些量瓶和单刻度微量吸量管为装量仪器。滴定管、一般吸量管和量筒等,均为卸量仪器。卸量量瓶比较少见。

2. 吸量管有单刻度和多刻度两种。单刻度吸量管亦称移液管,多刻度吸量管也简称为刻度吸量管。单刻度吸量管有普通和奥氏两种。多刻度吸量管有血清吸量管和莫氏吸量管两种。

3. 用普通单刻度吸量管卸放液体时,须将管尖靠紧受纳器内壁,使液体自行流出。流完后,使管尖在受纳器壁上停留3—5秒钟,同时转动吸量管。遗留在管尖内的少量液体任其自然,不要吹出。使用奥氏吸量管时,必须将遗留在管尖中的少量液体吹入受纳器内。奥氏吸量管有0.5、1.0、2.0和3.0毫升数种,比普通单刻度吸量管准确,常作定量实验使用。某些奥氏吸量管带有玻璃塞。

4. 血清吸量管刻度至尖端。卸放总量时,遗留在尖端的少量液体不须吹出。莫氏吸量管总量刻度在尖端以上。卸放液体时,按照刻度进行。

5. 读吸量管刻度时,应背对光线,眼睛和刻度划线在同一水平上。

6. 容量仪器上的刻度,为一般定量实验使用,足够准确,无须重新校订。

7. 一般容量仪器的容积均在20°C下校准。使用时,如温度差

异在 5°C 以内, 容积改变不大, 可以略去不计。

分析天平的使用和保护

分析天平为一种精密仪器, 极易由于不正确的使用而遭受损坏。使用前, 熟记下列事项。

1. 保持砝码和天平内外绝对清洁。
2. 每次使用前, 检查天平位置是否平衡, 并校对零点。如零点距离中点过远, 必须校正后再用。
3. 在移动或更换盘上载物、砝码和梁上游码时, 必须先将天平横梁架起, 将称盘托稳。架梁托盘和添减砝码等动作必须轻巧, 勿使天平遭受任何剧烈振动。架梁须俟指针摆到零点左右时进行。
4. 称重时, 须先放盘托, 再放梁架。注意勿使天平摆动幅度过大。
5. 被称量的物品必须放在表面皿上或称量瓶内, 不可直接放在天平盘上。称量能腐蚀金属并有挥发性质的药品时, 必须在带盖的称量瓶中称量。其他吸水、吸氧、吸二氧化碳和能挥发的物质, 也必须装在带盖的称量瓶内称量。
6. 称量液体物品时, 须特别小心。勿滴洒在天平内、天平盘上和砝码上。
7. 被称量物品和砝码必须尽量放在称盘的中央。
8. 被称量的物品和盛器的温度必须和天平室的室温接近。
9. 必须用带有骨制摄头的小摄子移动砝码和游码, 不可用手。砝码上如有灰尘, 可用驼毛刷轻轻拂拭。不能用抹布和任何溶剂洗刷砝码。
10. 称量完毕后, 支起天平横梁, 并将称盘托稳。游码必须挂起, 并将砝码顺序放回砝码盒内。
11. 砝码重量可在天平盘上检数一次。放入砝码盒中的空格

时,再檢数一次。

12. 离开天平前,全面檢查一遍。最后关严玻璃門并套上布罩。

13. 使用中如发生障碍或意外,应立即通知教員或实验員。不要自行檢修。

离心机的使用

欲使沉淀与母液分开,有过滤和离心两种方法。有下列情形者以离心为宜。(1)沉淀有粘性;(2)沉淀顆粒小,容易透过滤紙;(3)沉淀之量多而松;(4)沉淀之量很少而需要定量測量;(5)母液粘稠;(6)母液量很少,分离时应减少損失;(7)沉淀和母液必須迅速分开;(8)一般胶体溶液。

离心机有手搖式和电动式两种。使用时,应注意下列事項。

1. 离心机上的对称双耳环,重量須相等。

2. 对称的金屬套管或金屬套杯和玻璃离心管或离心瓶的重量与式样須相近似。

3. 套管或套杯內須放橡皮垫。

4. 套管或套杯和离心管或离心瓶之間須装水緩冲,以免互碰破碎。

5. 对称的金屬套管或套杯,連同离心管或离心瓶,管內或瓶內内容物和緩冲用水的总重量必須相等。离心前,必須在普通天秤上平衡。如不相等,可調整对称离心管內内容物的量或緩冲用水的量。

6. 离心所需速度的高低和時間的长短,以沉淀性质为轉移。高速度短時間的离心效果較低速度長時間的离心效果好。但不可无限制地追求速度,以免发生危險。

7. 如用电动离心机,必須将盖子盖严。开动时,先开电門,然后撥动电阻,使速度慢慢增加。

8. 在轉动时, 离心机机身应稳, 声音均匀。否則, 表示对称离心物件重量不等。如发现玻璃离心管瓶破碎, 須立即停止离心, 小心清除玻璃碎屑。

9. 停止离心时, 須先关电門, 然后将电阻撥至零位(最大电阻位置), 使离心机自行停止。不能用手强制离心机停止运动, 否則, 沉淀被攪动浮起, 而离心机也容易受损伤。

10. 勿使帶有緩冲用水的套管或套杯在离心机內长期悬挂。以免离心机件损坏。

光电比色計的原理和使用

以待測物已知濃度的显色溶液为标准, 比較未知濃度显色溶液的透光度来測定其濃度的方法为比色法。比色法的灵敏度常超过重量分析法和容量分析法, 是生物化学實驗中常用的一种定量分析方法。其操作过程也較簡便。

一、简单原理:

有色溶液的透光度决定于:

1. 有色物质的性质;
2. 溶液的厚度;
3. 溶液的濃度;
4. 单色光的波长。

根据比耳(Beer)定律, 当光波接近于单色光时, 其透光度为:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-KLC} \quad (1)$$

I_0 是入射光强度; I 是透射光强度; $\frac{I}{I_0}$ 为透光度(有人用 T 来代表); L 为溶液的厚度; C 为溶液的濃度; K 为常数(与溶液性质有关)。

取式(1)中的兩項对数, 則得:

$$\log \frac{I}{I_0} = -KLC \text{ 或 } \log \frac{I_0}{I} = KLC \quad (2)$$

$\log \frac{I_0}{I}$ 称为光密度, 可以用 D 表示。

$$\log \frac{I_0}{I} = D = KLC \quad (3)$$

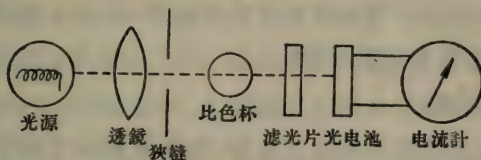
从式(3)中可以看出, 在单色光的情况下, 光密度与有色物质的濃度成正比(当溶液濃度在一定範圍內)。若已知某有色溶液濃度为 C , 光密度为 D , 待测液濃度为 C_x , 光密度为 D_x , 两种溶液的厚度相等, 均为 L , 则可按下列关系式求出待测液濃度。

$$D = KLC \quad D_x = KLC_x$$

$$\frac{D}{D_x} = \frac{C}{C_x}$$

$$\therefore C_x = \frac{D_x}{D} \cdot C \quad (4)$$

利用光电管将光能轉变成电能, 根据电流强度比較光的强弱来設計的比色仪器, 称为光电比色計。附图是单光电池比色計的示意图, 光經過透鏡、固定的狹縫(都是相当寬的)、比色杯和滤光片



单光电池比色計示意图。

照射到光電池上时, 电流計的指針就偏斜。先在比色杯中装空白样品, 再将指針調节到光密度为零。調节的方法很多, 如减低光源的亮度(用电阻); 加大或縮小狹縫(虹彩光圈); 或在光電池与电流計之間加电阻調节之。后者是最常用的方法。用光电比色計可以測出已知和未知濃度溶液的光密度, 然后从式(4)中求出未知溶液濃度。

为了满足 Beer 定律所需的条件,应当使用单色光源,实际上是使用某一定波长单色光的滤光片。选择滤光片的原则是:滤光片透光度最大的光波是溶液透光度最小(或吸收最大)的光波。在大多数情况下,最合适的滤光片是溶液的补色。选择滤光片时可参考下表。

波 长 (毫微米)	溶 液 的 颜 色	滤 光 片 的 颜 色
400—435	青紫	綠色帶黃
435—480	藍	黃
480—490	藍色帶綠	橘紅
490—500	、綠色帶藍	紅
500—560	綠	紫
560—580	綠色帶黃	青紫
580—595	黃	藍
595—610	橘紅	藍色帶綠
610—750	紅	綠色帶藍

二、光电比色計的操作要点及注意事項(以上海科偉仪器厂出品的 581 型光电比色計为例)。

1. 操作要点:

(1)检查电源开关是否断路,旋轉粗細調节到零位置,然后接通电源。

(2)选择合适滤光片,插入比色槽旁細縫內。

(3)轉动电源开关至“1”,旋轉零点調节器,使电源指針指示透光为零处。在测定过程中零点調节器位置固定不变。

(4)在盛有空白液和待测液(已知及未知濃度的溶液)的比色杯分别放入比色槽內,盖上盖子。将装有空白液的比色杯推入光路中。

(5) 将电源开关撥至“2”，电源灯即明亮。經数分钟电流恒定后，轉动粗細調节器，使电流指針指示透光度为 100 处(光密度为零处)。

(6) 移开空白杯，将待测液的比色杯推入光路中。此时电流指針指示之讀数即为待测液之光密度值。

(7) 重复讀数 2—3 次，取平均讀数。

(8) 每次測完后，将电源开关撥至“1”处，再更換待测液。

(9) 比色完毕，关闭电源开关，并恢复粗細調节器到零点位置。

(10) 測定時間如需超过 30 分钟，应使仪器休息 10 分钟后再使用。

2. 注意事項:

(1) 装入待测液或空白液时，必須达到比色杯 $2/3$ 左右(約装 4.5—6 毫升)。若不慎倒出，务必用滤紙吸干比色杯，再用揩鏡紙揩干后，才能放入比色槽內。

(2) 不要用手、滤紙、毛刷等擦拭比色杯的光滑面，以免損坏和磨毛。

(3) 用完比色杯后，立即用自来水冲洗，再用蒸餾水洗淨。洗淨后，可将比色杯倒置晾干，或用滤紙先将水分吸掉，再用揩鏡紙輕輕揩干。

(4) 比色計应防止强烈光照，暂时不用时，可将开关撥至“1”。不用时，应撥至“0”处。使用或檢查时，須插滤光片，以保护光电池。

(5) 比色計不能随意挪动，以防止震坏微型电流計。

(6) 比色計內干燥袋(內装硅胶)須經常檢查，如发现硅胶变藍，必須更換(变藍的硅胶經烘干至无色后，仍可使用)。

(7) 如較長時間使用比色計，須按操作要点的規定，給仪器以适当的休息。

試剂的配制

[1] Molisch 氏試剂: 取 α -萘酚 2 克溶于 95% 酒精稀釋至 100 毫升。临用前新配。

[2] Seliwanoff 氏試剂: 取間苯二酚 0.05 克溶于 50 毫升濃盐酸內, 再用水稀釋至 100 毫升。

[3] Tollen 氏試剂: 取 20% 間苯三酚的 95% 酒精溶液 30 毫升, 加濃盐酸 150 毫升, 用水稀釋至 270 毫升。

[4] Bial 氏試剂: 取 1.5 克甲基間苯二酚(地衣酚)溶于 500 毫升濃盐酸, 并加入 20—30 滴 10% 三氯化铁。

[5] Fehling 氏試剂:

試剂 A(硫酸銅溶液): 将 34.5 克硫酸銅結晶($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 毫升蒸餾水中。

試剂 B(酒石酸鉀鈉碱性溶液): 将 125 克氫氧化鈉和 137 克酒石酸鉀鈉(Rochelle 盐)溶于 500 毫升水。貯于帶橡皮塞的瓶內。

临用时, 将試剂 A 与試剂 B 等量混合。

[6] Benedict 氏試剂: 将无水硫酸銅 17.4 克溶解于 100 毫升热水中。冷后, 稀釋至 150 毫升。取檸檬酸鈉 173 克及无水碳酸鈉 100 克, 加水 600 毫升, 加热使之溶解。溶液如不清亮, 过滤。冷后, 稀釋至 850 毫升。最后把 CuSO_4 溶液傾入檸檬酸鈉-碳酸鈉溶液中。混匀后, 用狹口瓶貯存。此試剂可保存很久。

[7] Barfoed-Tauber-Kleiner 三氏試剂: 将醋酸銅 48 克溶解于 900 毫升沸水中。若有沉淀, 不必过滤。在热溶液中立即添加 8.5% 乳酸 50 毫升。搖匀, 待所有沉淀几乎溶尽后, 稀釋至 1,000 毫升, 并过滤。

[8] 磷鉬酸試剂: 在燒杯中, 加入 150 克純的鉬酸和 75 克无水碳酸鈉, 逐漸加水并搖动(約 500 毫升), 加热至沸, 使全部鉬酸

溶解, 滤去不溶物(很少)。在滤液中加入 300 毫升 85% 磷酸, 冷却, 冲稀至 1,000 毫升。

[9] 盐酸苯胍-醋酸鈉混合物: 取苯胍盐酸 2 份, 醋酸鈉 3 份, 于乳鉢上研混即得。苯胍在空气中不稳定, 因此, 通常用較稳定的苯胍盐酸盐。因为成脲反应必須在弱酸性溶液中进行, 使用时, 須加入适量的醋酸鈉以緩冲盐酸的酸度。所用醋酸鈉也不能过多。

[10] 血液: 可用 Francke 氏針刺破手指, 用 0.1 毫升吸量管直接吸取。如用动物全血, 則必須用氟化鈉作抗凝剂。氟化鈉同时可以抑制血糖的酵解。在一干燥試管内加入适量的氟化鈉粉末(每毫升血液加 5 毫克), 使动物血直接流入試管内, 随流随搖, 使与氟化鈉混合。放冷处或冰箱中保存备用。

[11] 0.005N 标准铁氰化鉀碱性溶液: 用分析天平称取純铁氰化鉀 1.65 克。用蒸餾水在 1,000 毫升量瓶內溶解后, 添加預先在白金坩堝(也可用瓷坩堝)中煅燒过的无水碳酸鈉 10.60 克。最后加蒸餾水稀釋到刻度。将溶液倒入蒸汽洗过的带色瓶內, 并放在阴暗处保存。可保存两个月。

注意: 純铁氰化鉀中不应含有 Fe^{+++} 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{----}$ 离子, 可用下法鉴定:

Fe^{+++} 試法: 取 5% 铁氰化鉀溶液 5 毫升, 加 10% 硫酸及亚铁氰化鉀各一滴。如有 Fe^{+++} 存在, 則呈藍色。灵敏度, 0.01 毫克 Fe^{+++} 。

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{----}$ 試法: 取 5% 铁氰化鉀溶液 1 毫升, 加新配制的 1% 三氯化铁溶液和 1N 盐酸各数滴。有 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{----}$ 存在时, 則呈藍色。灵敏度, 0.02 毫克 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{----}$ 。

若铁氰化鉀不純, 可依下法进行重結晶。先用冷蒸餾水冲洗铁氰化鉀, 再用热水溶解成飽和溶液。趁热用水洗过的滤紙滤入蒸发皿中, 在冰箱中放置过夜, 使之結晶。在布氏漏斗上抽滤結晶,

最后放入 50°C 烘箱内烘干。用棕色玻璃瓶储存备用。

[12] 氯化物-硫酸鋅-碘化鉀溶液：將硫酸鋅 50 克和氯化鉀 250 克溶於水中，稀釋到 1,000 毫升。使用時，再在每 200 毫升溶液中溶解碘化鉀 5 克。

[13] 0.005*N* 標準硫代硫酸鈉溶液：將 50 毫升 0.1*N* 標準硫代硫酸鈉溶液（見試劑配制法 16）稀釋到 1,000 毫升。臨用前新配。

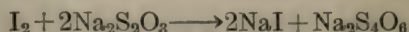
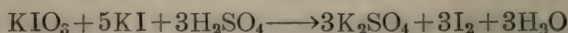
[14] 0.5*N* 氫氧化鈉酒精溶液：溶解約 20 克 NaOH 於 40 毫升水中，再將此氫氧化鈉溶液慢慢地加入 960 毫升 95% 酒精中，即得 0.5*N* 氫氧化鈉酒精溶液。

[15] Hanus 氏溶液：取 12.2 克碘，放入 1,500 毫升錐形瓶內，徐徐加入 1,000 毫升冰醋酸（99.5%），邊加邊搖，同時略加溫熱，使碘溶解。冷卻，加溴約 3 毫升。

注意：所用冰醋酸不應含有還原物質。取 2 毫升冰醋酸，加少許重鉻酸鉀及硫酸。若無綠色呈現，則證明無還原物質存在。

[16] 0.1*N* 標準硫代硫酸鈉溶液：將結晶硫代硫酸鈉 50 克，溶在經煮沸後冷卻的蒸餾水中（無 CO₂ 存在）。添加硼砂 7.6 克或氫氧化鈉 1.6 克。（硫代硫酸鈉溶液在 pH9—10 最穩定）。稀釋到 2,000 毫升後，可用標準 0.1*N* 碘酸鉀溶液按下法标定：

準確地量取 0.1*N* 碘酸鉀溶液 20 毫升與 10% 碘化鉀溶液 10 毫升和 1*N* 硫酸 20 毫升混合。以 1% 淀粉溶液作指示劑，用硫代硫酸鈉溶液進行标定。按下列反應式計算硫代硫酸鈉溶液濃度後，用水稀釋至 0.1*N*。



[17] 蛋白質溶液：除去卵黃的雞蛋白與 19—20 倍容積的水混合後，通過數層紗布過濾。

[18] Millon 氏試剂: 汞 40 克溶于比重 1.42 的濃硝酸 60 毫升中, 在水浴上溫热, 帮助溶解。溶后, 用 2 倍的蒸餾水稀釋之。待澄清后, 取出上清液使用。

[19] 次溴酸鈉溶液: 在冰冷却下, 将 2 克溴溶于 100 毫升 5% 氫氧化鈉中。将溶液保存在棕色瓶內, 并放在冷暗处。两周內有效。

[20] Ehrlich 氏重氮試剂:

溶液 A: 溶解 5 克亚硝酸鈉于 1,000 毫升蒸餾水中。

溶液 B: 溶解 5 克磺胺酸 (α -氨基苯磺酸) 于 1,000 毫升水中。溶后, 加入 5 毫升濃盐酸。

将 A 和 B 两溶液保存在密閉瓶內。需用时, 以 1:50 比例配合。

[21] 蛋白质氯化鈉溶液: 取 3 个鸡蛋, 除去卵黄, 将鸡蛋清与 700 毫升蒸餾水及 300 毫升飽和食盐水混合后, 通过数层紗布过滤。

[22] 碘化鉀-碘化汞溶液: 将碘化鉀 5 克溶解于 50 毫升蒸餾水中。加碘化汞 12 克飽和之, 并加蒸餾水至 100 毫升。

[23] 酪蛋白-乙酸鈉溶液: 取純淨酪蛋白 0.25 克, 盛于 50 毫升容量瓶內加入蒸餾水約 20 毫升, 并准确地加入标准的 1N 氫氧化鈉 5 毫升。当酪蛋白溶解后, 准确地加入标准的 1N 醋酸 5 毫升, 加水稀釋至 50 毫升, 充分搖勻。

[24] 中性甲醛溶液: 取市售甲醛溶液蒸餾。取蒸餾液 45 毫升, 加 0.5% 酚酞指示剂 3 毫升, 再加 0.1N 氫氧化鈉溶液至呈淺粉紅色。使用前, 重新进行中和。

[25] 猪血清: 取猪血置离心管或离心杯內。放在冰箱中过夜后, 离心除去血凝块。上层清液即为血清。

[26] 混合指示剂:

(1) 把溶解于 95% 酒精的 0.1% 溴甲酚綠溶液 10 毫升和溶于 95% 酒精的 0.1% 甲基紅溶液 2 毫升混合而成。

(2) 可用田氏指示剂, 由 50 毫升 0.1% 甲烯藍酒精溶液与 200

毫升 0.1% 甲基紅酒精溶液混合配成。酸性为紫紅色，碱性为綠色。变色范围很狹且灵敏。

[27] 双縮脲試剂: 将 1.5 克硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)和 6.0 克酒石酸鉀鈉溶于 500 毫升水中, 在不断攪拌下, 加入 300 毫升 10% 氫氧化鈉。稀釋至 1,000 毫升。

[28] 二苯胺試剂: 将 4 克二苯胺溶于 400 毫升冰醋酸中, 再加上 11 毫升濃硫酸(比重 1.84)。(如冰醋酸不純, 試剂呈藍或綠色)。

[29] 鉬酸銨溶液(檢查磷酸盐用): 将鉬酸銨($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2 克溶解在 100 毫升 10% 硫酸中。

[30] α -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸原液: 将 0.25 克 α -1, 2, 4-氨基萘酚磺酸, 15 克亚硫酸氫鈉及 0.5 克亚硫酸鈉溶于 100 毫升水中。在使用前, 取 1 体积原液, 加 4 体积水。

[31] 精餾氯仿: 用蒸餾水洗滌市售的純氯仿 2—3 次。加一些燒燬的碳酸鉀或无水硫酸鈉进行干燥, 并在暗色玻璃燒瓶中蒸餾。

[32] 三氯化銻氯仿飽和溶液: 用少量精餾氯仿反复洗滌三氯化銻, 直到氯仿不再呈色为止。放在干燥器內, 用硫酸干燥。用干燥的三氯化銻和精餾氯仿配置飽和溶液。

[33] 重氮試剂(参考[20]):

溶液 A: 将对-氨基苯磺酸 1 克溶解于 15 毫升濃盐酸中, 然后加水稀釋至 100 毫升。

溶液 B: 将亚硝酸鈉 0.5 克溶解于水中, 稀釋至 100 毫升。每次用前新配。

需用时, 将溶液 B 3 毫升加入溶液 A 100 毫升中, 混合即得。

[34] 碳酸氫鈉碱性溶液: 氫氧化鈉 20 克溶于 600 毫升蒸餾水中, 加碳酸氫鈉 28.8 克。混勻后, 用水稀釋到 1,000 毫升。

[35] 尼克酸提取液: 取干酵母 10 克, 于乳鉢中研細, 把細末移入 125 毫升錐形瓶內, 加 0.1N 盐酸 50 毫升。將錐形瓶用手或放在电动震蕩机上搖动 1—2 小时。在室溫下放置过夜后, 过滤或离心, 除去固体杂质。

[36] Folin 氏試剂: 取 10 克錳酸鈉, 2 克磷鉬酸, 5 毫升 85% 磷酸溶液和 75 毫升蒸餾水混合。加热迴流 2 小时。冷后, 加水稀釋至 100 毫升。

[37] 2,6-二氯酚靛酚鈉溶液: 將 50 毫克 2,6-二氯酚靛酚溶解于約 200 毫升含有 52 毫克碳酸氫鈉的热水中。冷后, 稀釋到 250 毫升。用靛色瓶盛装, 并放在冰箱里(3°C)儲藏。2,6-二氯酚靛酚不甚稳定, 每周必須重新配制, 每次使用前依下法标定:

取 5 毫升标准抗坏血酸溶液加 5 毫升 1% 草酸, 以 2,6-二氯酚靛酚滴定呈粉紅色, 并在 15 秒钟內不退色为終点。計算 2,6-二氯酚靛酚溶液的濃度。

标准抗坏血酸溶液: 溶解 100 毫克純抗坏血酸粉状結晶于 1% 草酸中, 然后稀釋到 500 毫升。在使用前临时配制。

[38] 蔗糖酶溶液: 取干酵母 100 克, 置于乳鉢內, 添加适量蒸餾水及少量細沙。用力研磨提取約 1 小时, 再加蒸餾水, 使总体积約为 500 毫升, 过滤。將滤液保存于冰箱內备用。

[39] 碘化鉀-碘溶液: 將碘化鉀 20 克及碘 10 克溶于 100 毫升水中。使用前, 稀釋 10 倍。

[40] 脲酶提取液: 取黃豆粉 6 克, 加 30% 酒精 250 毫升, 振蕩 10 分钟, 过滤。可保存 1—2 星期。

[41] Nessler 氏試剂: 先将 30 克碘化鉀溶于 20 毫升蒸餾水中, 再加入 22.5 克碘, 并搖动使之溶解。溶后, 加純汞 30 克, 繼續搖动, 直至上清液失去黃色为止。为防止溫度升高太多, 搖动时可用冷水冷却。傾出上层清液。

将清液数滴滴入 1 毫升 1% 淀粉溶液中。检查有无游离碘存在, 如无蓝色出现, 再添加以上 10% 碘溶液数滴, 使清液与淀粉反应呈微蓝色。最后稀释成 200 毫升。混匀后, 将所得液体全部倾入 975 毫升准确配制的 10% 氢氧化钠溶液中。均匀混和, 静置使成澄清。

[42] 0.05% 酪氨酸溶液: 准确地称取酪氨酸 0.1 克。在 200 毫升容量瓶中, 加 0.01*N* 碳酸钠溶液约 150 毫升, 使酪氨酸溶解。为了加快溶解, 可将量瓶放在热水浴中微热。冷至室温后, 稀释到刻度。每毫升溶液含 0.5 毫克酪氨酸。

[43] 愈创木脂酒精溶液: 取愈创木脂 1 克, 溶解于 100 毫升 95% 酒精中。

[44] 2% 琼脂溶液: 取 2 克琼脂, 用 0.5% 磷酸氢二钾溶液加热溶解。调节 pH 到 7。使用前, 在沸水浴上溶化, 并冷却至 45°C。

[45] 肌肉糜: 用重物击头杀死动物(鼠或兔), 迅速将血放尽。取背部及腿部肌肉, 在低温处, 用剪刀剪成碎块, 并在乳钵中磨碎。使用前制备。

[46] 白菜提取液: 取白菜叶约 5 克, 置于乳钵内磨碎。加蒸馏水 15 毫升, 搅匀后过滤。

[47] 酸性鸡蛋清蛋白溶液: 将 80 毫升 2% 卵清蛋白溶液与 20 毫升 0.03*N* 盐酸溶液混合均匀。

[48] 醋酸盐缓冲溶液, pH=4.0: 将 164 毫升 0.1*N* 醋酸溶液与 36 毫升 0.1*N* 醋酸钠溶液混合。

[49] 新鲜肌肉提取液: 以铁锤击头杀死动物(大白鼠或家兔), 将血放尽。迅速取下背部及腿部肌肉, 置于乳钵内, 用剪刀剪碎。添加约 4 倍于肌肉重量的生理盐溶液。仔细磨成匀浆。30 分钟后, 用浸湿的麻布或 4 层纱布过滤。将滤液保存于冰箱内。提取液必在实验当天配制。

[50] Locke 氏溶液: 将氯化鈉 0.9 克, 氯化鉀 0.042 克, 氯化鈣 0.024 克, 碳酸氫鈉 0.015 克和葡萄糖 0.1 克溶于水中。稀釋至 100 毫升。

[51] 0.5*N* 丁酸溶液: 取 45 毫升正丁酸, 用 1*N* 氫氧化鈉中和至 pH=7.6, 并稀釋至 1,000 毫升。

[52] 0.1*N* 碘溶液: 称取 12.7 克碘和約 25 克碘化鉀, 放入 1,000 毫升量瓶中, 加水溶解。溶解后, 稀釋至刻度。混匀。用标准 0.1*N* 硫代硫酸鈉标定。

[53] 丙酮酸鈉标准液 (2.0 微克分子/毫升): 取分析純丙酮酸鈉 11 毫克溶解于 50 毫升磷酸緩冲液內 (此溶液不能久置, 每次做标准曲綫时, 宜当日新鮮配制)。

[54] 谷丙轉氨酶底物: 取分析純 α -酮戊二酸 29.2 毫克, DL-丙氨酸 1.78 克置于小燒杯內, 加 1*N* NaOH 約 10 毫升至完全溶解。用 1*N* 氫氧化鈉或 1*N* 盐酸校正其 pH 至 7.4。加磷酸緩冲液稀釋至 100 毫升。然后加氯仿数滴防腐。在冰箱內可保存一周。此溶液每 1.0 毫升含 α -酮戊二酸 2.0 微克分子, 丙氨酸 200 微克分子。

[55] 2,4-二硝基苯肼溶液: 将分析純 2,4-二硝基苯肼 19.8 毫克称入 200 毫升錐形瓶內, 加 100 毫升 1*N* 盐酸。2,4-二硝基苯肼溶解較慢, 把錐形瓶放在暗处不时搖动。待全部溶解后, 滤入褐色玻璃瓶, 并置冰箱中保存。

[56] 谷氨酸溶液: 取谷氨酸 1.47 克, 溶于 100 毫升 1% 碳酸氫鉀溶液中。

[57] 酚溶剂: 取新蒸餾的无色苯酚 2 份和蒸餾水 1 份 (按重量計算), 放入一大小合适的分液漏斗中。振蕩混合, 使成乳状液。靜置 7—10 小时, 俟其分成两层后, 放出下层使用。

[58] 亚硝酸鈷鈉溶液: 将 25 克晶体硝酸鈷 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 溶于 50 毫升水中, 加 12.5 毫升冰醋酸, 混匀。另将 120 克亚硝酸

鈉溶于 180 毫升水中(其体积約为 220 毫升)。量取 210 毫升与以上配制的硝酸鈷溶液混合。用空气将混合溶液中的氧化氮气体吹淨,放在冰箱內保存。临用前过滤。

[59] 0.2*N* 草酸鈉溶液: 在称量瓶中准确地称取干燥过的草酸鈉粉末 0.67 克,用水冲洗入 500 毫升量瓶內。溶解后,稀釋至刻度并混匀。放在冰箱內保存。

[60] 0.02*N* 高錳酸鉀溶液: 称取晶体高錳酸鉀約 3.25 克,放入 1.2 或 2 升大燒杯內。加蒸餾水約 1,000 毫升,慢慢加热并攪拌,使之溶解。冷却后,經石棉过滤。此高錳酸鉀溶液的濃度約为 0.1*N*。

准确地量取 25 毫升 0.02*N* 草酸溶液,加 2 毫升硫酸溶液,混匀后加热煮沸。趁热用以上的高錳酸鉀溶液滴定。算出高錳酸鉀溶液濃度后,用冷的新煮沸过的蒸餾水稀釋到 0.02*N*。

[61] 1:2 亚硝酸鈉溶液: 以 100 毫升的水溶解 50 克 NaNO_2 。

[62] 鉬酸鉍溶液: 将 25 克純鉬酸鉍溶于 300 毫升蒸餾水中。另将 75 毫升濃硫酸加入約 100 毫升蒸餾水中,随加随攪拌。冷后,稀釋到 200 毫升,最后将以上稀硫酸溶液加入鉬酸鉍溶液中。混匀后,存放暗处。

[63] 标准磷酸溶液: 在称量瓶中准确地称取 0.0438 克干燥的磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)。用水冲洗入 1,000 毫升量瓶內。溶解后,稀釋到刻度。此溶液每毫升含有 0.01 毫克磷。

[64] 砷磷鎢酸試剂: 取 100 克鎢酸鈉($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)置 1,000 毫升燒瓶中,加水 600 毫升使溶解,再加純五氧化砷 50 克,85% H_3PO_4 25 毫升,濃盐酸 20 毫升。煮沸 20 分钟。冷却后,稀釋至 1,000 毫升,此液可长久保存。

[65] NaCN 溶液: 配成 5% NaCN , 每 100 毫升加濃 NH_4OH 2 毫升。配妥后,2—3 星期內可用,久則不能使用。注意 NaCN 为劇

毒!

[66] 标准尿酸溶液: 取一 500 毫升量瓶, 以水 200 至 300 毫升溶解結晶磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)9 克及結晶磷酸二氫鈉($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)1 克。如不清亮, 过滤, 再用热水稀釋至 500 毫升。准确地称尿酸 200 毫克, 置 1,000 毫升量瓶內, 加水少許, 将上面的热磷酸盐溶液倒入, 混合之, 使尿酸完全溶化。冷却后, 加冰醋酸 1.4 毫升, 再加水至刻度。加氯仿 5 毫升混匀防腐。此液 5 毫升含有 1 毫克尿酸。使用前, 取此液 10 毫升, 置 500 毫升容量瓶中。加水 400 毫升 11:9 稀 HCl 25 毫升, 再稀釋至刻度。混合均匀。每 10—14 日須重新配制一次。

[67] 緩冲溶液: 在 100 毫升容量瓶中, 用 75 毫升水溶解結晶草酸鈉 15 克, 添加冰醋酸 1 毫升。然后稀釋至 100 毫升。

[68] 脲酶溶液: 称硅酸鋁鈉粉 3 克以 3% 醋酸冲洗一次, 再以水冲洗两次。加細刀豆粉 5 克及 15% 酒精 100 毫升, 輕輕搖蕩 10—15 分钟。放置半小时, 間或搖蕩, 用細滤紙过滤。过滤时用玻罩將滤器盖上, 以防蒸发。

[69] 磷酸盐溶液: 取 60 克磷酸氫二鈉($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 和 20 克磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)溶解于水中, 稀釋至 1,000 毫升。

[70] 生理盐溶液: 将 4 毫升 1.15% 氯化鉀溶液, 3 毫升 0.11 M 氯化鈣溶液, 1 毫升 0.154 M 硫酸鎂溶液和 21 毫升 0.1 M 磷酸氫二鈉溶液 (用 0.1 N 盐酸中和到 $\text{pH} = 7.3$) 混合。混合后, 稀釋至 10,000 毫升。檢查并調节 pH 到 7.3。

緩冲溶液及其配制

弱酸的解离程度服从质量作用定律。醋酸的解离关系如下, 1.86×10^{-5} 是醋酸的解离常数。

$$[\text{H}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-] = 1.86 \times 10^{-5}[\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$[\text{H}^+] = 1.86 \times 10^{-5} \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}$$

从以上可知氢离子浓度决定于醋酸的解离常数与醋酸分子和醋酸根离子的比值。当增加醋酸根离子的浓度时,如加入醋酸钠,氢离子浓度则减少。因为醋酸钠几乎是完全解离的,而醋酸解离度很小,可以用醋酸钠的量代表溶液中醋酸根离子的量。所以醋酸与醋酸钠混合物的氢离子浓度决定于醋酸与醋酸钠的比值:

$$[\text{H}^+] = 1.86 \times 10^{-5} \frac{[\text{CH}_3\text{COOH}]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]}$$

如果我们忽略稀释时对于醋酸和醋酸钠解离的影响,那么以上公式说明,稀释不影响氢离子浓度。例如,10毫升由等体积 0.1 N CH_3COOH 和 0.1 N CH_3COONa 混合的溶液稀释 10 倍后,其氢离子浓度改变不大。

由弱酸和弱酸强碱的盐的混合液,称为缓冲溶液。和酸或碱溶液相比,缓冲溶液在加入酸和碱时,更能保持氢离子浓度。

例如,0.005 N CH_3COOH 和 0.1 N CH_3COOH 与 0.1 M CH_3COONa 各半的混合溶液的氢离子浓度相近似。如果向体积相等的这两种溶液各加入一些 0.01 N HCl , 第一溶液的氢离子浓度的改变比第二个溶液就大得多。

配制缓冲溶液的方案很多,以下是配制 pH 3.72—5.57 的 0.2 M 醋酸缓冲液、 pH 5.27—8.04 的 $\frac{M}{15}$ 磷酸缓冲液和 pH 7.8—10.0 的 0.2 M 硼酸缓冲液的三种方案。

配制缓冲溶液用的重蒸馏水应预先在硬质玻璃烧瓶中煮沸,并在装有钠石灰和氯化钾管的瓶中储存。

0.2 M 醋酸钠溶液(pH 3.72—5.57): 1 M 醋酸溶液和不含碳酸盐的 1 M 氢氧化钠溶液等体积混合,配制 0.5 M 醋酸钠溶液,再稀释到 0.2 M 。

按照下表配制 pH 3.72—5.57 的 0.2M 醋酸緩冲溶液。

0.2M CH ₃ COOH	0.2M CH ₃ COONa	pH	0.2M CH ₃ COOH	0.2M CH ₃ COONa	pH
90	10	3.72	40	60	4.80
80	20	4.05	30	70	4.99
70	30	4.27	20	80	5.23
60	40	4.45	15	85	5.37
50	50	4.63	10	90	5.57

$\frac{M}{15}$ 磷酸緩冲溶液 (pH 5.29—8.04): 称量 9.078 克 KH₂PO₄ 溶于重蒸餾水, 在 1,000 毫升容量瓶中稀釋到刻度。

$\frac{M}{15}$ Na₂HPO₄ 溶液: 称量 11.876 克 Na₂HPO₄·2H₂O (Sørensen 氏 Na₂HPO₄·2H₂O) 溶于重蒸餾水, 在 1 升容量瓶中稀釋到刻度。如无 Na₂HPO₄·2H₂O, 可将新結晶的 Na₂HPO₄·12H₂O 在室溫下空气干燥 2—3 星期, 然后使用。

按照下表配制 pH 5.29—8.04 的 $\frac{M}{15}$ 磷酸緩冲溶液。

$\frac{M}{15}$ KH ₂ PO ₄	$\frac{M}{15}$ Na ₂ HPO ₄	pH	$\frac{M}{15}$ KH ₂ PO ₄	$\frac{M}{15}$ Na ₂ HPO ₄	pH
9.75	0.25	5.29	5.00	5.00	6.81
9.50	0.50	5.59	4.00	6.00	6.98
9.00	1.00	5.91	3.00	7.00	7.17
8.00	2.00	6.24	2.00	8.00	7.38
7.00	3.00	6.47	1.00	9.00	7.73
6.00	4.00	6.64	0.50	9.50	8.04

0.2M 硼酸緩冲溶液 (pH 7.8—10.0): 用蒸餾水重結晶硼酸两次, 并薄鋪在紙上干燥。称取 12.405 克硼酸和 14.912 克氯化鉀, 用重蒸餾水溶解后, 移入 1 升容量瓶中, 并稀釋到刻度。

0.2 M 氢氧化鈉溶液由飽和溶液标定配制。最后用重蒸餾水

稀釋至 0.2M。制备緩冲溶液时，准确地量取50毫升硼酸-氯化鉀溶液。按照下表添加 0.2M NaOH 溶液，并稀釋至 200 毫升。

M/5NaOH	pH	0.2MNaOH	pH	0.2MNaOH	pH
毫升		毫升		毫升	
2.61	7.8	12.0	8.6	32.0	9.4
3.97	8.0	16.3	8.8	36.8	9.6
5.90	8.2	21.3	9.0	40.8	9.8
8.50	8.4	26.7	9.2	43.9	10.0

計算公式

(这些計算公式为計算实验結果时参考核對使用)

实验八 粗脂肪的定量測定

$$\frac{A-B}{C} \times 100 = \text{粗脂肪}\%$$

式中： A = 提取瓶及粗脂肪共重；

B = 提取瓶重量；

C = 样品的重量。

实验九 碘值的測定

$$\frac{(A-B)T \times 100}{C} = \text{碘值}$$

式中： A = 滴定空白用去的硫代硫酸鈉溶液平均毫升数；

B = 滴定样品用去的硫代硫酸鈉溶液平均毫升数；

C = 样品重量；

T = 与一毫升 0.1N 硫代硫酸鈉溶液相当的碘的克数；

$$T = \frac{0.1 \times 127}{1000}$$

实验十五 Sørensen 氏甲醛滴定

$$(A-B) \times 1.4 = 2 \text{ 毫升被檢液中氨基氮的毫克数}$$

式中: A = 滴定被檢液消耗的 $0.1N$ 氫氧化鈉溶液平均毫升數^①;

B = 滴定對照液消耗的 $0.1N$ 氫氧化鈉溶液毫升數;

1.4 = 1 毫升 $0.1N$ 氫氧化鈉溶液相當的氮毫克數。

實驗十六 總氮量的測定

$$\frac{(A-B) \times 0.01N \times 14 \times 100}{C} = \text{血清含氮量(毫克\%)}$$

式中: A = 滴定樣品用去的鹽酸平均毫升數;

B = 滴定空白用去的鹽酸平均毫升數;

C = 未稀釋的血清毫升數;

$0.01N$ = 鹽酸的當量濃度;

14 = 氮的原子量。

實驗二十八 維生素C定量測定

$$\frac{(A-B) \times C \times 0.088 \times 100}{D \times E} = 100 \text{ 克樣品中維生素C的毫克數}$$

式中: A = 滴定被檢液所用去的 $2,6$ -二氯酚靛酚的平均毫升數;

B = 滴定空白所用去的 $2,6$ -二氯酚靛酚毫升數;

C = 被檢物提取液的總毫升數;

D = 滴定所取的被檢液毫升數;

E = 被檢樣品的重量。

1 毫升 $0.001N$ $2,6$ -二氯酚靛酚溶液相當于 0.088 毫克

① 當被滴定的溶液的 pH 接近中性時, 所消耗的氫氧化鈉毫升數為加入甲醛前後消耗的碱的總數。如果是滴定酸或碱水解液, 顯然, 在加甲醛前中和溶液所用去的碱或酸的數量均不應計算在內。在滴定酸溶液時, 可先用碱中和到粉紅色, 再用酸滴至顏色剛好消退, 然後加甲醛再滴至桃紅色。計算時, 只取加甲醛後用去的碱量。

維生素 C

实验四十六 胃蛋白酶活性的测定

$$X = \frac{S_1}{S_2} \times a \times 16$$

式中: X = 清蛋白消化过程中产生的酪氨酸毫克数;

$a = 0.3$ 毫升标准酪氨酸溶液中的酪氨酸毫克数;

S_1 = 消化样品滤液的光密度;

S_2 = 标准酪氨酸溶液的光密度。

样品总体积为 16 毫升, 因此, 在计算酪氨酸量的公式中乘以 16

实验五十 脂肪酸的氧化

$$X = \frac{(B - A) \times 0.9667 \times 10}{5}$$

式中: X = 样品中丙酮含量;

B = 滴定对照实验所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数;

A = 滴定样品所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数。

1 毫升 0.1 N 硫代硫酸钠相当于 0.9667 毫克丙酮。硫代硫酸钠的氧化还原当量等于它的分子量。

实验五十三 氨基酸的生酮作用

$$X = \frac{(B - A) \times 0.9667 \times 8}{5}$$

式中: X = 样品中丙酮的含量;

B = 滴定对照实验所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数;

A = 滴定样品所消耗的 0.1 N 硫代硫酸钠溶液毫升数。

实验五十四 血清中钾的测定

$$X = [C - (B - A)] \times 0.142$$

式中: X = 样品中鉀的毫克数;

A = 滴定时所用之 $0.02N$ $KMnO_4$ 毫升数;

B = 所用 $0.02N$ $Na_2C_2O_4$ 之毫升数;

C = 最初加入 $0.02N$ $KMnO_4$ 毫升数。

实验五十五 血清中鈣的測定

$$X = (A - B) \times 0.2 \times 100$$

式中: X = 100 毫升血清中含鈣之毫克数;

A = 滴定样品所使用的 $0.01N$ $KMnO_4$ 毫升数;

B = 滴定空白所使用的 $0.01N$ $KMnO_4$ 毫升数。

实验五十六 血中无机磷的測定

$$\frac{\text{未知液讀数}}{\text{标准液讀数}} \times 0.02 \times \frac{100}{0.5} = 100 \text{ 毫升全血(血清)中磷的毫克数}$$

实验五十七 血中胆固醇測定

$$\frac{\text{未知液讀数}}{\text{标准液讀数}} \times 0.5 \times \frac{100}{0.5} = 100 \text{ 毫升全血含胆固醇的毫克数}$$

实验五十八 尿酸的測定

$$\frac{\text{未知液讀数}}{\text{标准液讀数}} \times 0.2 = 10 \text{ 毫升稀釋尿中尿酸毫克数}$$

实验五十九 尿素的測定

$$X = \frac{\text{未知液讀数}}{\text{标准液讀数}} \times 0.5 \times \frac{24 \text{ 小时尿总体积}}{0.05}$$

$$\text{尿素量(克)} = \text{尿素氮量}(X) \times 2.14$$

$$X = 24 \text{ 小时尿中尿素氮量(克)}$$

一些常用数据表

(1)一些元素的原子量

元 素		原 子 量	元 素		原 子 量
氢	H	1.008	锌	Zn	65.38
锂	Li	6.94	砷	As	74.91
铍	Be	9.01	硒	Se	78.96
硼	B	10.82	溴	Br	79.92
碳	C	12.011	铷	Rb	85.48
氮	N	14.008	锶	Sr	87.63
氧	O	16.000	钼	Mo	95.95
氟	F	19.00	钯	Pd	106.7
钠	Na	22.99	银	Ag	107.88
镁	Mg	24.32	镉	Cd	112.41
铝	Al	26.98	锡	Sn	118.70
硅	Si	28.09	锑	Sb	121.76
磷	P	30.975	碲	Te	127.61
硫	S	32.066	碘	I	126.91
氯	Cl	35.457	铯	Cs	132.91
钾	K	39.10	钡	Ba	137.36
钙	Ca	40.08	钨	W	183.86
钛	Ti	47.90	铱	Os	190.2
钒	V	50.95	铂	Pt	195.23
铬	Cr	52.01	金	Au	197.0
锰	Mn	54.94	汞	Hg	200.61
铁	Fe	55.85	铅	Pb	207.21
钴	Co	58.94	铋	Bi	209.0
镍	Ni	58.71	钍	Th	232.15
铜	Cu	63.54	铀	U	238.07

(2) 市售濃酸和濃氨水的比重和濃度

名 称	比 重	百 分 濃 度	克 分 子 濃 度
鹽 酸	1.19	37.2	12.0
鹽 酸	1.18	35.4	11.3
硝 酸	1.425	71.0	16.0
硝 酸	1.4	65.6	14.5
硫 酸	1.84	95.3	18.0
氯 酸	1.15	70	11.6
磷 酸	1.69	85	14.7
醋 酸	1.05	99.5	17.4
醋 酸	1.075	80	14.3
氨 水	0.904	27	14.3
氨 水	0.91	25	13.4
氨 水	0.957	10	5.4

(3) 一些酸的解离常数

酸	解 离 常 数	酸	解 离 常 数
磷酸 一級解离	1.1×10^{-3}	乳酸	1.55×10^{-4}
磷酸 二級解离	1.95×10^{-8}	醋酸	1.86×10^{-5}
磷酸 三級解离	3.6×10^{-13}	尿酸 一級解离	1.5×10^{-6}
草 酸 一級解离	3.8×10^{-2}	碳酸 一級解离	3.04×10^{-7}
草 酸 二級解离	4.9×10^{-5}	碳酸 二級解离	6×10^{-11}
水楊酸	1.06×10^{-3}	硼酸	6.6×10^{-10}
酒石酸 一級解离	9.7×10^{-3}	酚	1.3×10^{-10}
酒石酸 二級解离	6.9×10^{-5}	檸檬酸 一級解离	8×10^{-4}
馬尿酸	2.3×10^{-4}	檸檬酸 二級解离	2×10^{-5}
甲酸	2.05×10^{-4}	檸檬酸 三級解离	4×10^{-7}

(4) 指示剂

将强酸加到弱酸溶液，后者的解离度减少。这很容易从公式 $[H^+][A^-] = K[HA]$ 。如果 $[H^+]$ 增加，而 $[HA]$ 保持恒定，则为了保持平衡， $[A^-]$ 减少，即阴离子与氢离子结合成不解离的酸。若阴离子具有解离分子不同的颜色，则此时可以



观察到颜色的改变。这样的弱酸(或弱碱)能作为指示剂,按其颜色可确定溶液的氢离子浓度。

根据指示剂解离常数,在某一特定 pH 范围内,它的颜色改变最明显。我们常用指示剂的 pH 范围和颜色的改变如下:

名 称	pK_a	pH 范围	酸的颜色	碱的颜色
百里香蓝	1.5	1.2—2.8	红	黄
溴酚蓝	4.0	4.0—4.6	黄	蓝
溴甲酚绿	4.7	4.8—5.4	黄	蓝
甲基红	5.1	4.4—6.0	红	黄
氯酚红	6.0	4.3—6.4	黄	红
溴百里香蓝	7.0	6—7.6	黄	蓝
酚红	7.9	6—8.4	黄	红
百里香蓝(pK_2)	8.9	8—9.6	黄	蓝
酚酞	9.7	8—10.0	无色	粉红
麝香草酚酞	—	9.1—10.5	无色	蓝

(5)一些蛋白质的等电点

蛋 白 质	pI(等电点)	蛋 白 质	pI(等电点)
酪蛋白	4.62	小麦粒谷蛋白	7.1
血清清蛋白	4.64	玉米醇溶蛋白	6.2
血清球蛋白	4.8—6.4	麻仁球蛋白(大麻)	5.5
纤维蛋白原	5.4	卵清清蛋白	4.55—4.90
白明胶	4.7	鱼精蛋白	12.0—12.4
血红蛋白	6.74	胃蛋白酶	<1.0
氧合血红蛋白	6.6		

58.173057
171(-2)

0. 8093

杜惠君 78.4.22

杜惠君 83.4.13

58.173057
171(-2)

注 意

- 1 借書到期請即送還。
- 2 請勿在書上批改圈點，折角。
- 3 借去圖書如有污損遺失等情形須照價賠償。

博7-1

0. 8093

統一書號 13010 · 523

定 價 ¥ 0.50